

Série A - N° 1591
N° d'ordre 2457

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

R. K. SAKSENA

MAÎTRE DE CONFÉRENCES DE BOTANIQUE
A L'UNIVERSITÉ DE ALLAHABAD (INDIA)

1^{re} THÈSE.— RECHERCHES PHYSIOLOGIQUES ET CYTOLOGIQUES SUR
QUELQUES ESPÈCES DU GENRE PYTHIUM.

2^e THÈSE.— PROPOSITION DONNÉE PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le **5 DECE** 1935, devant la Commission d'examen

MM. GUILLIERMOND.... *Président,*
COMBES.....) *Examineurs.*
PLANTEFOL.)

PARIS

LIBRAIRIE GÉNÉRALE DE L'ENSEIGNEMENT

4, RUE DANTE, 4

—
1935

RECHERCHES
PHYSIOLOGIQUES ET CYTOLOGIQUES
SUR
QUELQUES ESPÈCES DU GENRE *PYTHIUM*

Série A - N° 1591

N° d'ordre 2457

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS-SCIENCES NATURELLES

PAR

R. K. SAKSENA

MAÎTRE DE CONFÉRENCES DE BOTANIQUE
A L'UNIVERSITÉ DE ALLAHABAD (INDIA)

1^{re} THÈSE.— RECHERCHES PHYSIOLOGIQUES ET CYTOLOGIQUES SUR
QUELQUES ESPÈCES DU GENRE PYTHIUM.

2^e THÈSE.— PROPOSITION DONNÉE PAR LA FACULTÉ.

Soutenues le

1935, devant la Commission d'examen

MM. GUILLIERMOND....	<i>Président,</i>
COMBES.....)	<i>Examineurs.</i>
PLANTEFOL.)	

PARIS

LIBRAIRIE GÉNÉRALE DE L'ENSEIGNEMENT

4, RUE DANTE, 4

1935

Faculté des Sciences de l'Université de Paris

MM.

Doyen honoraire. M. MOLLIARD.
Doyen...... C. MAURAIN, *Professeur*, Physique du globe.

<i>Professeurs honoraires</i>	H. LE CHATELIER.	Léon BRILLOUIN.	AUGER.
	H. LEBESGUE.	GOURSAT.	BLAISE.
	A. FERNBACH.	WALLERANT.	DANGEARD.
	A. LEDUC.	GUILLET.	JANET.
	Emile PICARD.	PÉCHARD.	LESPIEAU.
	Rémy PERRIER.	FREUNDLER.	MARCHIS.

PROFESSEURS

G. BERTRAND. T	Chimie biologique.	A. DUFOUR.... T	Physique (P. C. B.)
M. CAULLERY. T	Zoologie (Évolution des êtres organisés)	L. DUNOYER....	Optique appliquée.
G. URBAIN.... T	Chimie générale.	A. GUILLIER-MOND.... T	Botanique (P. C. B.).
Emile BOREL.... T	Calcul des probabilités et Physique mathém.	M. JAVILLIER....	Chimie biologique.
Jean PERRIN.... T	Chimie physique.	L. JOLEAUD....	Paléontologie.
H. ABRAHAM.... T	Physique.	ROBERT-LÉVY...	Zoologie.
E. CARTAN.... T	Géométrie supérieure.	F. PICARD.....	Zoologie (Évolution des êtres organisés).
M. MOLLIARD. T	Physiologie végétale.	Henri VILLAT. T	Mécanique des fluides et applications.
L. LAPICQUE.... T	Physiologie générale.	Ch. JACOB.... T	Géologie.
E. VESSIOT.... T	Mécanique analytique et Mécanique céleste	P. PASCAL.... T	Chimie minérale.
A. COTTON.... T	Recherches physiques.	M. FRÉCHET... T	Calcul des Probabilités et Physique mathématique.
J. DRACH.... T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	E. ESCLANGON. T	Astronomie.
Charles FABRY. T	Enseignement de Physique.	M ^{me} RAMART-LUCAS.. T	Chimie organique.
Charles PÉREZ. T	Zoologie.	H. BÉGHIN.... T	Mécanique physique et expérimentale.
Léon BERTRAND. T	Géologie structurale et géologie appliquée.	FOCH.....	Mécanique expérimentale des fluides.
P. PORTIER.... T	Physiologie comparée.	PAUTHENIER....	Physique (P. C. B.)
E. RABAUD.... T	Biologie expérimentale	De BROGLIE... T	Théories physiques.
M. GUICHARD...	Chimie minérale.	CHRÉTIEN	Optique appliquée
Paul MONTEL... T	Théorie des fonctions et Théorie des transformations.	P. JOB	Chimie générale.
P. WINTREBERT T	Anatomie et histologie comparées.	LABROUSTE.....	Physique du Globe.
L. BLARINGHEM T	Botanique.	PRENANT.....	Zoologie.
O. DUBOSCQ... T	Biologie maritime.	VILLEY.....	Mécanique physique et expérimentale.
G. JULIA.... T	Application de l'analyse à la Géométrie.	BOHN.....	Zoologie. (P. C. B.)
C. MAUGUIN... T	Minéralogie.	COMBES.....	Botanique.
A. MICHEL-LÉVY.	Pétrographie.	GARNIER	Calcul différentiel.
H. BÉNARD.... T	Mécanique expérimentale des fluides.	PÈRES	Mécanique des fluides
A. DENJOY.... T	Calcul différentiel et calcul intégral.	HACKSPILL....	Chimie (P. C. B.)
L. LUTAUD.... T	Géographie physique et géologie dynamique.	LAUGIER	Physiologie générale.
Eugène BLOCH. T	Physique théorique et physique céleste.	TOUSSAINT....	Technique Aéronaut.
G. BRUHAT.....	Physique.	M. CURIE.....	Physique (P. C. B.)
E. DARMOIS.....	Physique.	G. RIBAUD.... T	Hautes températures.
A. DEBIERNE. T	Radioactivité.	CHAZY.... T	Mécanique rationnelle
		GAULT.....	Chimie (P. C. B.).
		CROZE.....	Physique.
		DUPONT..... T	Théories chimiques.
		LANQUINE.....	Géologie.
		VALIRON.....	Mathématiques.

Secrétaire A. PACAUD.

Secrétaire honoraire... D. TOMBECK.



A M. le Professeur A. Guilliermond,
Membre de l'Académie des Sciences.

En témoignage de ma
reconnaissance et de mon
respectueux attachement.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INTRODUCTION

Avant 1885, quelques botanistes seulement, tels PRINGSHEIM, DE BARY, MARSHALL WARD, ont étudié, sur le vivant, les *Pythium*. C'est à FISCH, en 1885, que l'on doit la première étude du noyau chez ces Champignons ; c'est lui, en effet, qui décrit le processus d'une fusion nucléaire collective à l'intérieur de l'oogone. En 1894, P.-A. DANGEARD a montré que les oogones et les anthéridies de *Pythium proliferum* sont multinucléés. Plus tard, TROW (1901) a donné une description détaillée des phénomènes cytologiques chez *Pythium ultimum*, accompagnée d'une étude biologique de cette espèce. C'est dans cette même année que simultanément, mais indépendamment, MIYAKE a fait connaître les phénomènes de fécondation chez *P. de Baryanum* Hesse. Beaucoup plus tard, en 1915, une autre espèce, *P. aphanidermatum*, a été étudiée par EDSON et plus récemment encore (1927) PATTERSON a étudié l'oogenèse chez *P. torulosum*.

Pour compléter dans une certaine mesure les recherches de nos devanciers, nous nous sommes proposé de faire une étude cytologique et physiologique de diverses espèces du genre *Pythium* non examinées jusqu'ici et, dans ce but, nous nous sommes adressé aux *Pythium deliense* Meurs, *P. de Baryanum*, *P. mamillatum* Meurs et *P. indigoferae* Butler, mais c'est au premier, le *P. deliense*, que nous avons consacré le plus d'attention.

*
* * *

Avant d'exposer le résultat de nos recherches, nous voudrions dire, à tous ceux qui nous y aidèrent, notre reconnaissance.

M. le Pr GUILLIERMOND, Membre de l'Institut, nous a accueilli une première fois dans son laboratoire en 1931 avec la plus

grande obligeance. Contraint par la maladie, nous avons regagné Allahabad mais il n'a cessé, par lettre, de nous donner tous les conseils utiles pour poursuivre l'étude dont il nous avait proposé le sujet. A notre récent retour en France, il nous a réservé le même accueil sympathique d'autrefois et il a bien voulu examiner en détail les résultats de notre travail. Qu'il nous permette de lui dire quelle gratitude nous lui avons et quelle reconnaissance nous lui garderons pour ses conseils, son enseignement et son inépuisable bienveillance à notre égard.

M. le P^r MOLLIARD, Membre de l'Institut, a accepté de publier ce travail dans la *Revue générale de Botanique*. Cette acceptation a été pour nous un honneur dont nous lui resterons reconnaissant.

Notre ami, M. A. EICHORN, a bien voulu se charger de la traduction de notre travail et, ensuite, de la correction des épreuves. Il nous a aidé de maints conseils au cours de cette rédaction, de même qu'il n'a cessé, de 1931 à maintenant, de nous encourager à persévérer dans nos recherches. Il sait la reconnaissance que nous lui en gardons; il nous permettra, cependant, de la lui exprimer ici.

M. le D^r J. H. MITTER, directeur du Service botanique de l'Université de Allahabad, a toujours été pour nous extrêmement bienveillant, il nous a sans cesse prodigué toutes les facilités matérielles pour poursuivre notre étude et son appui auprès des autorités qualifiées pour nous permettre de séjourner en France nous a été très utile. Qu'il veuille bien trouver ici l'assurance de notre respectueuse reconnaissance.

A des titres divers, M. le D^r S. DUTT de Allahabad, Miss WESTERDIJK et M. le D^r MEURS nous ont rendu d'importants services que nous n'oublierons pas.

PLAN DU TRAVAIL

Ce travail est divisé en deux parties, l'une d'ordre physiologique, l'autre d'ordre cytologique. Dans la première nous avons envisagé la croissance des *Pythium* sur divers milieux et dans des conditions différentes, en vue de déterminer où se plaçait, dans chaque cas, le développement maximum, qu'il s'agisse, par exemple, de la température, du pH, etc. Les mêmes recherches ont été effectuées, en faisant varier les différents facteurs, susceptibles de l'influencer, à pro-

pos de la formation des organes sexuels. Nous avons ensuite déterminé le pouvoir hydrolytique des Champignons et, en prenant plus spécialement *P. deliense* pour objet d'étude, nous avons examiné en détail la germination des sporanges et la formation des zoospores. On trouvera, en tête des chapitres de cette première partie, quand il y avait lieu de le donner, un aperçu des travaux antérieurs, soit qu'ils aient trait directement aux *Pythium*, soit qu'ils se rapportent à d'autres Champignons inférieurs, mais présentent un intérêt de comparaison avec nos propres résultats.

Dans la seconde partie de ce travail, nous avons envisagé la cytologie de ces Champignons, vitalement et après fixation, cette étude, pour certains *Pythium*, n'ayant jamais été entreprise. Nous avons examiné les éléments du cytoplasme : chondriome et système vacuolaire, les noyaux, l'oogenèse et la fécondation, particulièrement chez *P. deliense*. A ce propos nous avons rappelé au début, succinctement, les travaux d'ordre cytologique effectués déjà sur ces Champignons, nous avons discuté ensuite, en détail, les travaux de nos prédécesseurs sur chaque point particulier, en rappelant aussi les idées générales émises par les cytologistes sur ces questions. Nous avons terminé ces chapitres par une discussion générale à propos de la cytologie des Champignons, que nous avons fait suivre d'une étude sur la position systématique et la nomenclature des *Pythium*.

Dans un dernier chapitre, enfin, nous avons groupé, brièvement résumés, les principaux résultats de notre travail.

MATÉRIEL

Les cultures de *Pythium deliense* ont été obtenues en novembre 1931 du Centraalbureau voor Schimmelcultures de Baarn (Hollande). Depuis cette époque nous l'avons appelé (SAKSENA 1932) *Pythium de Baryanum* Hesse. Ce Champignon avait été isolé par MEURS à Delli (Sumatra) sur des plants de Tabac et de 1930 jusqu'en octobre 1933 catalogué sous ce dernier nom. En octobre 1933, MEURS examina à nouveau diverses cultures de *Pythium* à Baarn et constata que ses propres cultures renfermaient une nouvelle espèce qu'il dénomma *Pythium deliense* MEURS (1934).

Comme *Pythium deliense* est une nouvelle espèce récemment

décrite, et dont la description ne se rencontre que dans le travail de MEURS, il ne nous paraît pas inutile d'en reproduire ici la diagnose (MEURS, page 179, 1934) : Hyphes hyalins, à contenu granuleux à l'état jeune, abondamment et irrégulièrement ramifiés, dont le diamètre varie de $2,6$ à 8μ 6 . Mycélium aérien faiblement développé. Sporangies terminaux, rarement intercalaires, pouvant atteindre 210μ de long, de diamètre variable, mais toujours plus grands que les hyphes parents. Tube germinatif le plus souvent terminal, plus rarement latéral, long ou court ; zoospores au nombre de 3 à 25 et peut-être davantage, réunies en une vésicule réniforme qui, après s'être arrondie, peut atteindre de 8 à 12μ de diamètre. Oogones terminaux globuleux de 15 à $23,1\mu$ de diamètre, le plus souvent entre $16,1$ et 20μ , moyenne $18,2$. Anthéridie simple (rarement au nombre de 2 sur un oogone) intercalaire ou terminale, le plus souvent filamenteuse avec un renflement latéral, longueur de 12μ 8 à 27 (le plus souvent $14,1-20,3$), largeur 4μ 7 à $15,5$ (le plus souvent $8,1-11,4$). L'anthéridie est ordinairement dressée, le rameau oogonial, qui dérive de la branche anthéridienne, est fortement incurvé vers l'anthéridie. Assez rarement les hyphes porteurs de ces deux organes sont des branches parallèles d'un même hyphe de fort diamètre. Oospores ramassées ne remplissant pas les oogones et variant de 12μ 5 à $17,5$ de diamètre, le plus souvent $13,7-16,2$, moyenne $14,8$, avec une membrane de 0μ 9 à $2,2$ d'épaisseur, le plus souvent $1,3-1,8$, moyenne $1,62$ et un globule de réserve de 6 à 10μ de diamètre, le plus souvent $7,3-8,2$, entouré d'une couche granuleuse de protoplasme dans laquelle on distingue un corps réfringent.

Les autres *Pythium* étudiés ici proviennent également de Baarn.

LES FIXATEURS ET LA FIXATION

Nous avons essayé un assez grand nombre de fixateurs (1) et, principalement, pour l'étude du mycélium. Pour l'examen des

(1) Les formules des liquides fixateurs utilisés sont les suivantes :

Liquide de Flemming faible : pour 20 cm^3 d'eau distillée :

Acide chromique à $0,4\%$ 15 cc.

Acide osmique à 2% 4 cc.

Acide acétique glacial..... 1 cc.

durée de la fixation 24 heures.

noyaux nous nous sommes adressé au mélange faible de Flemming qui nous a, de beaucoup, donné les meilleurs résultats. Comparativement nous avons utilisé les liquides de Bouin, de Davis (1903), de Claussen (1908), de Trow (1904), de Merkel et, enfin, celui de Smith (1923) qui n'est autre qu'une modification de celui de Merkel. Pour l'étude du chondriome nous avons eu évidemment recours au liquide de Regaud et au mélange de Regaud-Tupa. Comparativement nous avons employé le liquide de Lenhossek (1) qui, bien que n'étant

- (1) Liquide de Bouin : formol du commerce : 10 cc.
 Solution saturée d'acide picrique.. 30 cc.
 Acide acétique glacial..... 2 cc.

durée de la fixation 24 heures.

a. Liquide de Davis :

- Acide chromique à 0.25 %
 Acide acétique à 0.1 %

fixation 24 heures et lavage comme après liquide de Flemming faible.

b. Liquide de Claussen :

- Acide chromique à 0.5 %
 Acide acétique à 1 %

même traitement que précédemment.

Liquide de Trow :

- Acide chromique à 0.7 %
 Acide acétique à 0.3 %

même traitement que précédemment

Liquide de Merkel :

- Acide chromique à 1 %..... 1 cc.
 Chlorure de platine à 1 %..... 1 cc.
 Eau distillée..... 6 cc.

même traitement que précédemment.

Liquide de Merkel modifié par Smith (1923).

- Acide acétique à 5 %..... 20 cc.
 Chlorure de platine à 1 %..... 1 cc.
 Acide chromique à 1 %..... 2 cc.

fixation pendant 24 heures à froid et pendant 6 heures à chaud (70°C).

Lavage 24 heures à l'eau courante.

Pour le chondriome nous avons utilisé le liquide de Regaud : bichromate de K, 80 cc., formol neutre 20 cc. Fixation pendant 4 jours, ensuite postchromisation par le bichromate de K à 3 ou 5 % pendant 7 à 15 jours, lavage 24 heures.

Le liquide de Regaud-Tupa, nitrate d'urane 1 gr., formol neutre 20 cc., bichromate de K 3 % 80 cc., fixation 24 heures.

Liquide de Helly : bichromate de K 2 gr. 5, bichlorure de mercure 5 gr., eau distillée 100 cc. A cette solution on ajoute, pour 9 cc., 1 de formol neutre au moment de l'emploi. Fixation de 8 à 12 heures et postchromisation, dans une solution saturée de bichromate de K à 40%, pendant 48 heures. Lavage 24 heures.

Liquide de Lenhossek. Bichlorure de mercure à 6 %, 75 cc., alcool absolu 20 cc., acide acétique 3 cc., fixation et ensuite lavage de 24 heures.

Le sublimé formol : solution saturée de sublimé 80 cc., formol neutre 20 cc. Fixation 8 à 24 heures et postchromisation dans le bichromate de K à 5 % pendant 2 à 7 jours, lavage 24 heures à l'eau courante.

pas un fixateur mitochondrial, s'est montré capable, dans ce cas particulier, de conserver le chondriome (cf. page 67), comme aussi le sublimé-formol; mais c'est incontestablement le liquide de Helly postchromisé qui nous a donné les résultats les meilleurs.

Pour l'examen des organes sexuels, et spécialement de leurs noyaux, c'est surtout la solution forte de Flemming (1) qui nous est apparue la meilleure. Pour l'étude du chondriome dans ces organes nous avons eu recours, comme fixateur, au liquide de Helly.

LA COLORATION

Nous nous sommes le plus souvent servi de l'hématoxyline avec coloration de fond à l'érythrosine; nous avons utilisé également le violet de gentiane à 1%. Par contre, la méthode de Gram utilisée par Couch (1932) ne nous a pas donné d'excellents résultats.

Voici la série des manipulations que nous avons adoptées pour nos colorations du mycélium en masse.

a) Pour les noyaux.

1° après fixation et lavage, passage dans une solution à 3% d'eau oxygénée durant 15 à 30 minutes;

2° lavage dans l'eau distillée pendant un quart d'heure en renouvelant l'eau plusieurs fois;

3° mordantage à l'alun de fer à 4% pendant 4 à 6 heures;

4° lavage à l'eau distillée pendant 15 minutes en renouvelant l'eau plusieurs fois;

5° coloration à l'hématoxyline pendant la nuit;

6° lavage à l'eau jusqu'à ce que l'eau ne soit plus colorée;

7° différenciation à l'alun de fer à 2% avec contrôle sous le microscope;

8° lavage à l'eau de une demi-heure à une heure;

9° passage dans une solution aqueuse d'érythrosine à 1% pendant 30 secondes environ;

10° lavage à l'eau pour chasser l'excès de colorant; toutefois une légère surcoloration est préférable, à ce stade;

(1) Acide chromique à 1% 15 cc., acide osmique à 2% 4 cc., acide acétique glacial 1 cc., fixation de 6 à 12 heures, lavage 24 heures.

11° passage par la série des alcools suivants avec séjour de 5 minutes dans chaque : 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% ; un peu d'érythrosine disparaît alors ;

12° passage de deux fois 5 minutes dans l'alcool absolu ;

13° séjour de 5 minutes dans chacun des mélanges suivants :

alcool absolu 5/6 et xylol 1/6

— 2/3 — 1/3

— 1/2 — 1/2

— 1/3 — 2/3

— 1/6 — 5/6

14° deux passages de 5 minutes dans le xylol ;

15° montage au baume de Canada après avoir étendu une mince couche de mycélium sur la lame.

b) Pour le chondriome.

Après fixation, postchromisation et lavage :

1° séjour de 24 heures dans l'alun de fer à 4%,

2° lavage à l'eau distillée pendant 15 minutes,

3° coloration à l'hématoxyline pendant 24 heures,

ensuite même technique que pour les noyaux, mais il est préférable de ne pas colorer à l'érythrosine.

On peut simplifier la technique en passant par les alcools à 30, 50, 70, 90 et absolu et par les mélanges de

alcool absolu 2/3 et xylol 1/3

— 1/2 — 1/2

— 1/3 — 2/3

et enfin xylol.

Technique de préparation des coupes des organes sexuels.

Après fixation et lavage, la déshydratation a été effectuée par passage dans les alcools à 20, 30, 40 et 50% (séjour d'une heure dans chaque), 60, 70, 80, 90% (séjour de 2 heures dans chaque) ; ensuite passage dans deux bains successifs d'alcool absolu, avec séjour de 3 heures dans chaque.

Passage dans les mêmes mélanges d'alcool et de xylol que précédemment pour les noyaux du mycélium : avec séjour de 1 heure dans chacun d'eux ; séjour de 2 heures dans le xylol ; mélanges de

xylol et de paraffine, ces mélanges ont été renouvelés de façon à éliminer de plus en plus le xylol et finir par un bain de paraffine pure.

Les coupes ont été faites à l'épaisseur de 3 à 4 μ .

Pour le déparaffinage et la coloration, les coupes ont été traitées de la manière suivante : séjour de 5 minutes dans le xylol, puis de 5 minutes dans un mélange de xylol et d'alcool absolu à parties égales et de 5 minutes encore dans l'alcool absolu, puis de une minute dans chacun des alcools suivants : 90, 80, 70, 50 et 30%, enfin de 2 minutes dans l'eau. Le blanchiment et le lavage comme précédemment, de même pour le mordantage, la coloration et la différenciation. Pour le montage, passage de 2 minutes dans chacun des alcools à 30, 50, 70, 80 et 90% et de 5 minutes dans l'alcool absolu, dans un mélange à parties égales d'alcool absolu et de xylol.

Technique de Bowen (1929-1930).

La fixation a lieu par le mélange de Kolatchev. Lavage dans l'eau courante pendant 24 heures, après quoi le matériel est traité soit :

a) par l'acide osmique à 1% ou à 2% à la température de 35° pendant 4 à 10 jours, ou

b) par l'acide osmique à 1% ou à 2% d'abord, à 40° pendant 8 heures et ensuite à 35 pendant 4 à 10 jours ou, enfin,

c) par l'acide osmique à 2% à 40° pendant 4 à 10 jours.

L'acide osmique a été changé dans tous les cas après les 4 premiers jours. Les résultats obtenus ont, d'une façon générale, été comparables. Nous nous sommes appliqué à suivre la technique de Bowen dans ses plus minutieux détails.

Procédés microchimiques.

Nous avons eu recours aux techniques habituellement en usage pour déceler les lipoïdes (Soudan III, solubilité dans le chloroforme, etc., etc...); protéïdes (réactif de Millon, etc...); cellulose (acide iodhydrique, etc...); callose (bleu coton, coralline, en dissolution dans une solution aqueuse de $\text{Na}^2 \text{Co}^3$ à 4%); glycogène (solution iodo-iodurée); chitine (sol. iodo-iodurée et acide sulfurique).

MILIEUX DE CULTURE

Nous avons utilisé pour nos cultures deux sortes de milieux : des milieux naturels et des milieux synthétiques.

A. — Milieux naturels.

1^o Milieux solides : I. Agar. — II. Farine d'Avoine. — III. Farine de Blé (1). — IV. Farine de Maïs. — V. Soja. — VI. *Lagenaria vulgaris*. — VII. *Cucurbita moschata*. — VIII. *Trichosanthes dioica*. — IX. *Luffa aegyptica*. — X. *Musa*. — XI. *Citrullus vulgaris*.

2^o Végétaux : a) racines. — XII. Carottes. — XIII. Radis. — XIV. Navets. — XV. *Abutilon indicum*. — XVI. Tabac. — XVII. Betterave.

b) tubercules. — XVIII. Pommes de terre.

c) tiges. — XIX. Cannes à sucre. — XX. Tabac.

d) bourgeons. — XXI. Choux-fleurs.

e) feuilles. — XXII. Choux-fleurs. — XXIII. *Brassica oleracea*. — XXIV. Rhubarbe. — XXV. Tabac. — XXVI. *Indigofera enneaphylla*. — XXVII. *I. linifolia*. — XXVIII. Betteraves.

f) fruits : XXIX. Gourde. — XXX. Potiron mûr et non mûr. — XXXI. Concombre. — XXXII. *Trichosanthes dioica*. — XXXIII. *Luffa*. — XXXIV. *Averrhoa corambola*. — XXXV. *Goyave*. — XXXVI. Bananes. — XXXVII. Pommes. — XXXVIII. Tomates, mûres ou non.

g) graines. XXXIX. Ricin. — XL. Pois. — XLI. Haricot.

h) plantules. — XLII. Cresson. — XLIII. Concombres. — XLIV. Betterave.

3^o Liquides : XLV. Soja. — a) 25 graines par litres ; b) 50 graines par litre.

XLVI. Pois. — a) 25 graines par litre ; b) 50 graines par litre.

B. — Milieux divers.

1^{er} Milieux solides : XLVII. Peptone de Merck-agar : peptone à 0,1, 0,2, 0,25, 0,3, 0,4, 0,5 et 2%. — XLVIII. Bactopeptone de Merck-agar : peptone à 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5 et 1%. — XLIX. Milieu de Brown. — L. Extrait de malt d'orge de Kepler. — LI. Extrait de malt à l'huile de foie de morue de Kepler.

(1) Cornflour (Brown and Polsons', Londres).

2° Milieux liquides : LII. a) Peptone à 0,1, 0,25, 0,5, 1 et 2%.
b) Bactopeptone à 1%.

LIII. Saccharose à 1%. — LIV. Maltose à 1%. — LV. Amidon soluble à 1%. — LVI. Peptone à 0,1% plus maltose à 0,5 ou 1%. — LVII. Acide acétique à 1%. — LVIII. Glucose à 1%. — LIX. Inuline à 1%. — LX. Glycogène à 1%.

C. — Tissus animaux. LXI. Fourmis. — LXII. Scolopendres.

Modes de préparation des milieux de culture.

Les milieux furent placés à l'autoclave pendant 20 minutes à une température de 250° et à la pression de 15 atm. Pour les milieux solides on a ajouté 20 gr. d'agar par litre de liquide. Pour l'agar à la farine d'Avoine la formule utilisée est la suivante :

Quaker oats : 30 gr. ; agar : 15 gr. ; eau : 1 litre.

La farine de Blé a été utilisée à raison de 30 gr. par litre, celle de maïs à raison de 30 ou de 15 gr. par litre. Pour la préparation de l'agar à la farine de Maïs on a procédé de la façon suivante : on verse 15 gr. de farine de Maïs dans 500 cc. d'eau distillée et dans un autre récipient 20 gr. d'agar dans la même quantité d'eau ; on place au bain-marie les deux mélanges pendant 30 minutes, on filtre ensuite le premier à travers un linge mince et l'on complète à 500 cc. avec de l'eau distillée ; on mélange ensuite avec l'agar et, enfin, on stérilise.

Les graines de Soja, au nombre de 25 ou de 50, ont été mises à bouillir dans un litre d'eau pendant 2 heures. Après filtration on complète à 1 litre et on ajoute 20 gr. d'agar, on stérilise ensuite.

Pour les milieux VI à IX on a utilisé 200 gr. de fruits, non pelés, coupés en petits fragments pour 500 cc. d'eau. Après séjour au bain-marie pendant 1 heure, on a filtré et complété à 500 cc. D'autre part, on a préparé au bain-marie un mélange de 20 gr. d'agar dans 500 cc. d'eau distillée et, dans un cas, on a ajouté ce mélange au premier et porté à l'autoclave, dans un autre cas, les deux mélanges ont été stérilisés séparément à 3 reprises, pendant 20 minutes. Le pH des extraits de fruits a été évalué au potentiomètre, il est égal à 5,4 pour la Gourde et *Luffa* et à 5,6 pour *Cucurbita moschata* et *Trichosanthes dioica*.

Dans le cas de la Banane on a utilisé un extrait concentré. 500 gr. de bananes mûres, réduites en purée, sont ajoutés à 500 cc.

d'eau et le tout placé au bain-marie pendant 1 heure. On filtre sous pression ; au filtrat on ajoute 2% d'agar ; le pH avant stérilisation comme après a toujours été trouvé égal à 4,5.

Pour la préparation du milieu agar-graines de Melon d'eau on a suivi la technique de Sideris (1931).

Les milieux XII-XLIV ont été préparés de trois manières différentes. De petits fragments, après un lavage soigneux à l'eau distillée, ont été placés dans des boîtes de Petri et des tubes à essais. Dans chacune des boîtes on a ajouté un peu d'eau distillée et dans les tubes de l'eau jusqu'à la tubulure. Un lot a été stérilisé comprenant toutes les boîtes de Petri et une partie des tubes, le reste de ceux-ci l'a été par fractions.

Pour les milieux liquides XLV à XLVI les procédés ont été identiques à ceux employés pour V.

Pour la préparation du milieu de Brown on a préparé deux mélanges :

A	{	Asparagine.....	2 gr.		pour 100 cc. d'eau (on fait chauffer et on laisse refroidir).
		Sulfate de Mg...	0 gr. 75		
B	{	Phosphate de K.	1 gr. 25		pour 900 cc. d'eau (on fait chauffer et on laisse refroidir).
		Glucose	2 gr.		
		Amidon	10 gr.		

On mélange A et B et on ajoute 20 gr. d'agar ; on porte le tout au bain-marie jusqu'à parfaite homogénéité, on stérilise ensuite.

Les Fourmis et les Scolopendres ont d'abord été tuées par passage dans l'eau distillée bouillante et ensuite convenablement lavés à l'eau distillée, puis passés à l'autoclave dans de petites boîtes de Petri et enfin mis en tubes à essai avec un peu d'eau.

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE PHYSIOLOGIQUE DES *PYTHIUM*

CHAPITRE I. — DÉVELOPPEMENT

Nous avons essayé tous les milieux précédemment cités et nous avons obtenu au sujet du développement des Champignons les résultats suivants :

Pythium deliense Meurs a étéensemencé sur tous les milieux de culture précédents sauf sur les milieux XVII, XXVI, XXVII, XXVIII, XLIV.

Pythium de Baryanum a étéensemencé sur les milieux I à V, XI, XII, XL, XLI, XLII, LII et LVIII.

Pythium mamillatum a étéensemencé sur les milieux I à V, XI, XII, XVII, XLIII, XLIV, LII, LVIII.

Pythium indigoferae Butler a étéensemencé sur les milieux I à VI, XI, XII, XV, XVIII, XXVI, XXVII, XL à XLIII, LII et LVIII.

On voit ainsi que les Champignons ont tous étéensemencés sur les milieux I, II, III, IV, V, XI, XII, LII et LVIII. On peut, par conséquent, comparer leur développement réciproque sur ces milieux à la température de 30°C.

Sur milieu I. — Le développement a été faible. Il n'y a pas eu formation de mycélium aérien et les colonies ne se voient que difficilement ; il n'y a que quelques ramifications.

Sur milieu II. — Sauf pour *Pythium indigoferae*, le développement a été luxuriant et il s'est développé dans tous les cas un riche mycélium aérien blanchâtre.

Sur milieux III et IV. — Il s'est développé ici aussi un mycélium aérien blanchâtre peu abondant, spécialement sur les bords de la boîte. Le développement de *Pythium de Baryanum* a été particulièrement remarquable sur farine de Maïs.

Sur milieu V. — Les résultats sont les mêmes que sur milieu I.

Sur milieu XI. — *Pythium deliense* a donné un excellent développement blanchâtre aérien, moindre chez *P. de Baryanum*, moindre encore pour *P. indigoferae*.

Sur milieu XII. — On a obtenu, dans tous les cas, d'épaisses masses gélatineuses blanchâtres à la surface du substratum.

Sur milieu LII. — Sur peptone (poudre sèche de viande) le développement est ordinairement bien supérieur comparativement au milieu de bacto-peptone et les masses sont beaucoup plus épaisses dans le premier cas. Les hyphes sont moins larges sur bacto-peptone.

Les cultures ayant été faites dans des flacons de 150 cc., renfermant 60 cc. de la solution peptonée, on a vu les hyphes du *P. deliense* atteindre, après environ 2 jours, la surface du liquide et demeurer aériens pendant quelque temps. Il y a alors formation d'une plaque de mycélium blanchâtre d'aspect gélatineux (comme chez *Saprolegnia* : CHAZE 1925, VOLKONSKY, 1933) qui augmente peu à peu en épaisseur (Pl. II, fig. 18). Lorsque le développement s'opère plus ou moins en surface on ne voit guère, en effet, de mycélium en profondeur; le Champignon n'est, d'ailleurs, pas aquatique. Il en va de même pour *P. de Baryanum* et *P. mamillatum*, mais les masses sont moins épaisses. Du point de vue de l'épaisseur du feutrage superficiel des colonies on a, en décroissant : *P. deliense*, *P. de Baryanum* et *P. mamillatum*; du point de vue de la rapidité du développement, l'ordre est inverse, en ce sens que *P. deliense* atteint le plus vite la surface. Chez *P. indigoferae* les hyphes n'émergent jamais, mais restent toujours en dessous de la surface, même après 15 jours. A mesure que la quantité de peptone diminue, le développement se ralentit, pour cesser lorsque la concentration est descendue à 0.1% ce qui a pour conséquence la non formation d'une plaque de feutrage.

Sur milieu LVIII. — Nous n'avons obtenu aucun développement sur ce milieu. *P. deliense* a donné quelques hyphes, mais ceci était dû sans doute à la petite quantité de farine de Maïs apportée lors du repiquage.

Nous allons envisager maintenant le comportement de chacun de ces Champignons vis-à-vis des autres milieux non étudiés ci-dessus et particuliers à chacun d'eux, et nous porterons plus spécialement notre attention sur le *P. deliense*.

Pythium deliense. — Ce Champignon s'est développé sur tous les milieux sauf sur les milieux XXXIV et LVII. (On notera, d'ailleurs, que le pH du jus de fruit d'*Averrhoa* est égal à 2,1). Sur les milieux VI à X on a obtenu un excellent développement aérien. Sur *Musa* les hyphes étaient spécialement larges. Sur Navets et sur Betteraves on a obtenu un mycélium aérien blanchâtre, alors que sur les autres racines il n'était ni aérien ni blanchâtre. Sur Pommes de terre, le développement a été particulièrement abondant et a atteint une hauteur d'environ 2 cm. 5 à l'intérieur des boîtes de Petri.

Sur les milieux XIX et XXI on a obtenu un mycélium aérien blanchâtre, tandis que sur les feuilles et les plantules, comme sur les tissus animaux d'ailleurs, le mycélium est mince et non aérien, à l'inverse de ce qui se passe pour les graines. Avec les fruits le développement a été spécialement abondant et aérien sur : le Potiron non mûr, le Concombre, la Tomate et le *Tricosanthes*, moindre sur la Gourde, le *Luffa* et le Potiron mûr. Le résultat le moins bon a été rencontré sur le Goyave et il est assez difficile de dire pourquoi : sur la Banane et la Pomme, on n'a pas obtenu de développement aérien.

Sur liquide au Soja. — On n'a pas obtenu les plaques superficielles rencontrées sur les solutions peptonées. Au sujet de celles-ci les résultats ont été bien meilleurs avec la peptone (poudre sèche de viande) qu'avec la bactopeptone et, à mesure que le pourcentage en peptone s'accroît, le développement aérien s'intensifie.

Sur milieu amylicé de Bowen, il s'est formé un riche mycélium aérien blanchâtre, cependant que, en solution maltosée ou avec le glycogène ou l'inuline, si le développement était bon, le mycélium est demeuré, toutefois, en dessous de la surface du liquide, même après une semaine.

Sur milieu LVI les résultats ont été les mêmes qu'avec la solution peptonée à 1% et les hyphes périphériques se sont allongés sur les bords du récipient.

P. de Baryanum. — La croissance a été excellente sur les graines

de Pois et de Haricots, mais sur les plantules de Cresson, le mycélium n'était pas blanc.

Pythium mamillatum. — On n'a pas obtenu de développement aérien sur les plantules bouillies ou vivantes de Betteraves ou de Concombres.

Pythium indigoferae. — On a obtenu le développement du Champignon sur les milieux VI, XV, XVIII, XXVI, XXVII, XL, XLI, XLII et XLIII, mais jamais de mycélium aérien blanchâtre.

Dans tous les cas que nous venons de passer en revue, on obtient un mycélium ramifié, non cloisonné, et d'aspect hyalin, dont la structure interne est granuleuse. Lorsque le développement est bon, on constate l'existence de mouvements cytoplasmiques particulièrement intenses. D'une façon générale, certains hyphes pénètrent à l'intérieur du substratum, mais la plus grande partie du mycélium demeure périphérique et devient même aérien dans plusieurs cas. L'une et l'autre portion se ressemblent d'ailleurs et toutes deux peuvent porter les organes reproducteurs, bien que ceux-ci se forment plutôt à la surface du milieu de culture. On ne note aucune formation de rhizoïde, ni d'haustorium. Après quelque temps le mycélium aérien s'enfonce et ce phénomène débute généralement au centre de la colonie ; il diffère, par ailleurs, d'espèce à espèce et de milieu à milieu.

Degré de rapidité d'extension des colonies.

Le milieu utilisé dans ces expériences a été celui à la farine de Maïs et agar. Les prélèvements ont été effectués à partir de boîtes de Petri renfermant les Champignons divers et maintenues à la température de 30°. L'âge du repiquage était toujours de 48 heures. Le prélèvement a toujours été effectué à la périphérie de la colonie de façon à intéresser les extrémités de jeunes hyphes. On a pris soin de prélever des fragments de même dimension, soit d'environ 2 à 3 mm. de diamètre. Afin d'avoir des termes de comparaison suffisants, les expériences ont été poursuivies en triple et les résultats rapportés sont les moyennes des valeurs obtenues après 2 lectures dans chacun des trois cas comparables (1).

(1) Les dimensions des boîtes de Petri étaient de 14 cm.5 sur 2 cm.5 ; chacune contenait 50 cc. de substratum et étaient placées, avec le milieu à ensemer, à la température à laquelle les expériences devaient être conduites quelque temps auparavant.

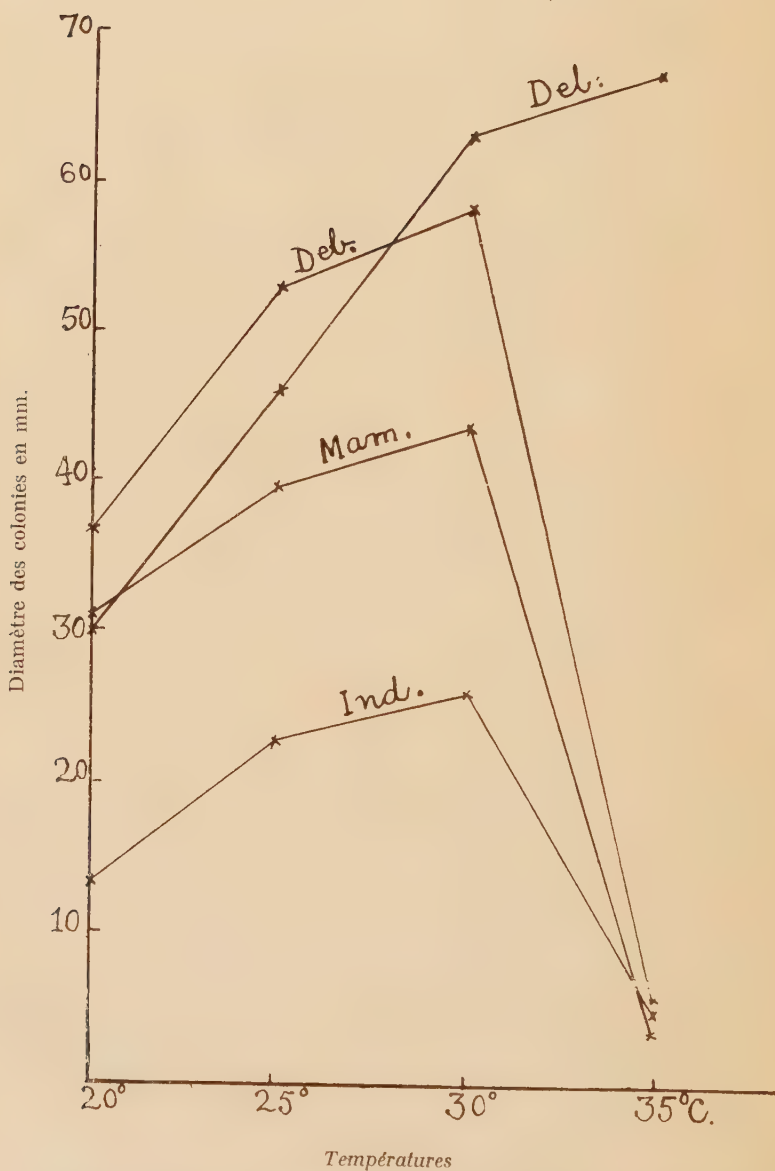


Fig. 1. — Courbes comparatives de croissance des Champignons pendant les 24 premières heures, à différentes températures. Deb. = *Pythium de Baryanum*; Del. = *P. deliense*; Mam. = *P. mamillatum*; Ind. = *P. indigoferae*.

Développement comparé des Champignons pendant les 24 premières heures à 20, 25, 30 et 35°C.

D'après le graphique ci-contre, on peut voir qu'à 20° *P. indigoferae* présente le développement le plus réduit, à l'inverse de *P. de Baryanum* qui s'est développé le mieux, tandis que les autres Champignons ont pratiquement les mêmes caractéristiques de croissance. A 35°C il n'a pas été possible de fixer avec certitude le degré de développement de *P. de Baryanum*, *P. mamillatum* et *P. indigoferae*, car cette croissance a été très restreinte, de plus, en raison de la température, des Moisissures ont envahi le milieu et gêné les observations. Néanmoins, il est évident qu'à 35° la croissance des *Pythium*, en dehors de *P. deliense*, est fortement réduite et sans doute à une température plus élevée aurait-elle même été arrêtée. Aussi peut-on placer pour ces trois Champignons l'optimum de température à environ 30° et à 35° la température maxima, alors que, pour *P. deliense*, on a les valeurs respectives de 35° (optimum) et de 40° C (maximum). On notera que les trois premiers Champignons, bien que *P. indigoferae* soit un épiphyte subtropical, ont pratiquement les mêmes températures optimale et maximale que *P. ultimum* (Trow, 1901) et *P. de Baryanum* var. *pelargonii* Braun (BRAUN, 1925), ce dernier ayant son optimum à environ 27°C. *P. indigoferae* est celui dont la croissance est la plus lente, vient ensuite *P. mamillatum* et, enfin, *P. de Baryanum*. *P. deliense* se développe lentement à 20°, mais à 25° il croît plus vite que *P. mamillatum* et à 30° il surpasse en rapidité de développement *P. de Baryanum*. Sauf chez *P. indigoferae* le mycélium devient légèrement aérien à 30° C.

Développement de *Pythium deliense* à différentes températures.

La température minimale pour son développement est à 10°C, alors que, à l'autre extrémité de l'échelle des températures, la croissance s'arrête après 40°, l'optimum se plaçant à 35°C. Jusqu'à 30° la courbe de la croissance est une droite, on remarque ensuite un plateau et, après 35°, la courbe redescend rapidement pour atteindre 0 à 45°C.

On voit, sur le graphique ci-dessous, combien est rapide la croissance aux températures avoisinant 15°.

Pour nous rendre compte si les températures inférieures à 10°, et supérieures à 45°, sont funestes au Champignon, les expériences suivantes ont été effectuées : 6 boîtes de Petri renfermant un milieu à la farine de Maïs-agar ont été divisées en 2 lots : A et B, de chacun 3 boîtes. Le premier lot a servi de témoin. Avant d'ensemencer les boîtes de la série B, celles-ci ont été maintenues à 10° pendant 12 heures. L'ensemencement a eu lieu en A et B en même temps, mais le premier lot est demeuré à la température de la chambre, alors

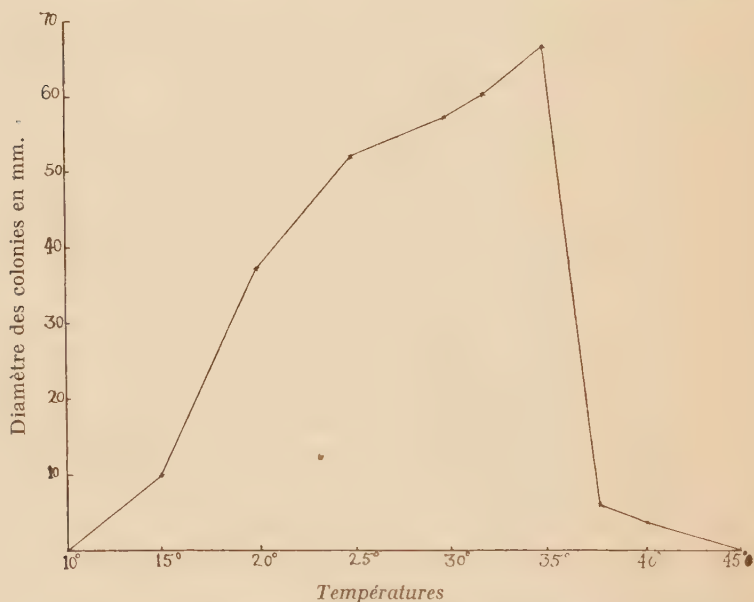


Fig. 2. — Courbe de croissance de *Pythium deliense* durant les 24 premières heures à différentes températures.

que le second était placé à 10°C. L'examen a été effectué 48 heures après. Il a montré que, dans les boîtes du lot A, le développement s'était effectué, tandis que dans celles du lot B, il n'y avait pas eu de croissance.

Les trois boîtes B furent maintenues à la température ordinaire pendant 48 heures ; après ce temps il a été possible de constater que le Champignon s'était bien développé. Reportées à 10°, on traça, après 24 heures, à l'aide d'un crayon à verre, le contour des colonies extérieurement sur les boîtes qui furent laissées pendant 10 jours

à cette même température. Après ce temps la croissance ne s'était pas poursuivie ; elle reprit dès que l'on eut remplacé les boîtes à la température ordinaire.

Des expériences de même nature furent effectuées à 45, à 7 et à 5°C. Elles ont permis de constater que le Champignon n'était pas tué même à 5° en ce qui concerne les températures inférieures, alors qu'il l'était dès après 24 heures à 45°C. Aux basses températures, et aussi au-dessus de 35°, la croissance est par conséquent

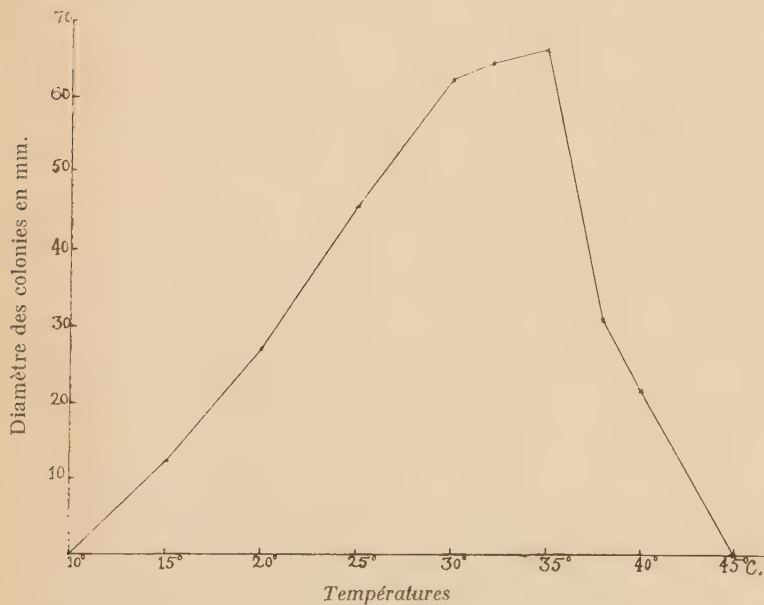


Fig. 3. — Courbe de croissance de *Pythium deliense* durant le deuxième jour, à différentes températures.

réduite et diffuse ; aux températures élevées, mais inférieures à 36°, il se forme un mycélium compact et les hyphes sont abondamment ramifiés. Entre 30 et 35° le mycélium devient partiellement aérien et blanchâtre et la forme des colonies n'est plus arrondie, mais irrégulière.

Action de certains corps sur la croissance de *P. deliense* à 27°C

On doit à LWOFF (1932) une classification physiologique des micro-organismes. Le fait que l'aliment organique azoté (par exem-

ple : la peptone, l'alanine) peut assurer l'alimentation carbonée de certains de ces organismes leur a fait donner le nom d'*haplotrophes* (tel le *Saprolegnia*), celui de *mésotrophes* étant appliqué à ceux capables de faire la synthèse de leurs protides à partir de NH^3 et ayant besoin d'un composé organique. Cet auteur a constaté que, chez ces derniers, la synthèse des protides à partir de NH^3 peut se faire, soit à partir du NH^2 des acides aminés, soit à partir des sels d'ammonium ou des nitrates préalablement réduits, c'est-à-dire à partir de composés azotés minéraux ou organiques simples. Si l'aliment azoté est minéral, une source carbonée organique est indispensable. D'après lui la grande majorité des Bactéries et des Champignons sont *haplomésotrophes*, car ils ont besoin d'une source azotée minérale (nitrate, sel d'ammonium) ou bien d'une source azotée organique simple (acide aminé).

En 1933, VOLKONSKY divisa les *mésotrophes* en quatre catégories : les *mésotrophes sensu stricto* (assimilation des nitrates et des sulfates), exemples : *Aspergillus* et *Sterigmatocystis* ; les *mésotrophes N* (non assimilation des nitrates, assimilation des sulfates), exemple : *Saccharomyces*, etc. ; les *mésotrophes N-S* (ni les nitrates, ni les sulfates ne sont assimilés), exemple : *Saprolegnia dioica* ; les *mésotrophes S* (non assimilation des sulfates, assimilation des nitrates), mais ce groupe ne comporterait à l'heure actuelle aucun exemple connu. D'autre part, il distinguait les Champignons quant à leur pouvoir d'assimilation ou de non-assimilation de l'ion SO^3 en : *eutiotrophes* et *parathiotrophes* (1933 a).

Plus récemment (1934), le même auteur a montré que les espèces de *Saprolegnia*, *Isoachlya*, *Dychtyuchus* et *Aphanomyces*, étudiées par lui, sont *haplomésotrophes N-S* et *parathiotrophes*, tandis que d'autres Champignons, tels *Pythium de Baryanum* et *Phytophthora* sp., *Rhinocladium*, *Ustilago* et toutes les *Gymnoascées* sont *haplomésotrophes* et *euthiotrophes*.

Personnellement nous avons utilisé les milieux suivants :

- | | |
|---|--|
| A. — NH^4NO^3 , MgSO^4 , KH^2PO^4 , KNO^3 | |
| et glucose, 0.1 gr. de chaque. . | |
| B. — les mêmes éléments, sauf NH^4NO^3 | } additionnés de 100 cc. H^2O
bi-distillée. |
| C. — les mêmes éléments, sauf MgSO^4 . . | |
| D. — les mêmes éléments, sauf Glucose . . | |
| E. — les mêmes éléments, sauf KNO^3 . . | |

Dans tous les cas nous avons ajouté des traces de Fe^2Cl^6 et 2% d'agar pur. Le prélèvement a été fait sur une culture maintenue sur agar pur à 2%. Dans le tableau ci-dessus, la croissance est évaluée en millimètres après 24 et 48 heures et la moyenne a été prise après 6 lectures.

	DIAMÈTRE DES COLONIES	
	APRÈS 24 HEURES	APRÈS 48 HEURES
A	38 mm.	79 mm.
B	17 mm.	50 mm.
C	26 mm.	61 mm.
D	37 mm.	81 mm.
E	37 mm.	80 mm.

On voit de suite que l'absence de NH^4NO^3 en B et de MgSO^4 en C nuit à la croissance et que bien qu'il y ait une source d'azote présente en B, grâce à KNO^3 , le développement est comparative-ment moindre. Il semble donc bien qu'il n'y ait *pas assimilation des nitrates* par notre Champignon ; la source d'azote doit être NH^3 , représentée ici par NH^4NO^3 . Sur milieu A, MgSO^4 étant présent, la croissance est bonne, ceci tient à l'assimilation des sulfates par le Champignon.

Nous avons de plus cultivé *P. deliense* sur un milieu liquide stérilisé contenant 0,1 gr. de chacun des corps suivants :

KH^2PO^4 , NH^4NO^3 , KNO^3 , MgSO^4 , glucose et 100 cc. d'eau bi-distillée, avec des traces de Fe^2Cl^6 . Le prélèvement (mycélium aérien seulement) était effectué d'une culture sur agar farine d'Avoine. L'examen était macroscopique.

Le développement sur ce milieu a été bon. Mais, lorsque l'on supprime soit NH^4NO^3 , soit le glucose, la croissance cesse. En l'absence de KNO^3 (mais en présence de NH^4NO^3) la croissance ne subit aucun retard, tandis qu'elle est un peu moins active en l'absence de MgSO^4 . On peut remplacer le glucose par 0,1 % de peptone.

Quelles conclusions pouvons-nous tirer de ces expériences ?

1° En l'absence de NH^4NO^3 , bien que KNO^3 soit présent, il

n'y a pas de développement, parce qu'il n'y a pas assimilation des nitrates qui ne peuvent ainsi servir de source d'azote.

2° En présence de NH_4NO_3 , que KNO_3 soit présent ou non, le développement est bon, et par conséquent la source d'azote est bien NH_3 .

3° La peptone peut remplacer le glucose comme source de carbone, en d'autres termes l'aliment organique azoté peut assurer la nutrition carbonée.

4° MgSO_4 ne suffit, ni n'est indispensable au développement. Cependant lorsqu'il est présent celui-ci est un peu plus actif, ce qui indique que le sulfate (en l'espèce l'ion SO_4) est assimilé.

En conséquence *P. deliense* est un organisme *euthiotrophe* au contraire de *Saprolegnia* (VOLKONSKY, 1934 a) qui n'utilise pas SO_4 . D'autre part, *P. deliense* est également haplotrophe, puisque l'aliment organique azoté (peptone) peut assurer la nutrition carbonée ; il est aussi mésotrophe, car il peut effectuer la synthèse des protides à partir de NH_3 . En un mot il est *haplomésotrophe*.

De plus, du fait qu'il n'est pas capable d'assimiler les nitrates, mais assimile les sulfates, il est, suivant la terminologie de VOLKONSKY : *haplomésotrophe* N. Il est ainsi à ajouter à la liste des organismes comprenant déjà : *P. de Baryanum*, *Phytophthora parasitica*, *P. palmivora*, *Rhizoglyphus Beurmanni*, *Ustilago Maydis* et toutes les Gymnoascées étudiées par VOLKONSKY (1934).

Effet du saccharose, du maltose et du glucose sur le développement de *P. deliense* à 30°C.

Ces sucres ont été ajoutés en diverses proportions à un milieu de bactopeptone à 0.1% et agar à 2%.

A. — Diamètre (en cm.) des colonies après 24 heures.

SUCRE	1 %	3 %	5 %	7 %	10 %
Saccharose.....	6.3	6.4	6.5	6.4	6.2
Maltose	6.0	5.9	6.1	6.1	5.6
Glucose	6.1	6.2	5.7	5.2	4.5

Témoin : (0.1 bactopeptone + 2% gélose) = 6.3 cm.

B. — Diamètre des colonies après 48 heures.

SUCRE	1 %	3 %	5 %	7 %	10 %
Saccharose.....	11.6	11.8	12.0	11.8	11.4
Maltose	10.9	10.7	11.3	11.3	10.5
Glucose	11.5	11.8	10.9	10.2	8.9

Témoin = 11.6 cm.

C. — Croissance durant es secondes 24 heures (B-A).

SUCRE	1 %	3 %	5 %	7 %	10 %
Saccharose.....	5.3	5.4	5.5	5.4	5.2
Maltose	4.9	4.8	5.2	5.2	4.9
Glucose	5.4	5.6	5.2	5.0	4.4

Témoin = 5.3 cm.

Le développement est plus particulièrement aérien avec 1% de sucres, il le devient de moins en moins à mesure que la concentration augmente.

Les résultats que nous venons de résumer dans les tableaux ci-dessus ne permettent pas de tirer de conclusions importantes. Il est évident qu'une concentration en sucre (maltose et glucose) trop élevée nuit au développement, mais d'une façon générale l'action des sucres sur la croissance ne paraît pas être primordiale.

Effet de l'acide tannique sur le développement du *P. deliense*.

On a préparé, pour cette culture, deux milieux, soit : a) farine de Blé 4% + agar à 2% et acide tannique à 0.5% et b) farine de Blé 4% + agar à 2% et acide tannique à 1.0%.

Ni dans l'un, ni dans l'autre cas, on n'a pu obtenir le développement du Champignon. La présence d'acide tannique, à quelque concentration que ce soit, est donc incompatible avec la croissance de cet organisme.

Effet du rouge neutre sur le développement du *P. deliense*.

En étudiant la coloration *intra vitam* nous avons remarqué que plus la concentration du colorant (ajouté à une solution de

peptone à 1%) était élevée, moins le développement était satisfaisant. Si l'on ajoute, par exemple, 4 mgr. ou 5 mgr. % de rouge neutre à une solution de peptone à 1%, dans des cultures effectuées à la température de la chambre, soit 20-24°, on constate que, même après une semaine, le Champignon n'a pas donné de feutrage mycélien important à la surface du liquide, alors que l'on peut en obtenir avec des quantités de colorant moindres : 1, 2 ou 3 mgr. %, pour la même quantité de liquide. Cette constatation peut être faite, d'ailleurs, à propos d'autres Champignons également.

Le rouge neutre à faible dose n'a pas d'effet nuisible sur la rapidité de la croissance. A haute dose il est toxique et retarde celle-ci. Des observations analogues ont déjà été faites par GUILLIERMOND (1929 a) et GUILLIERMOND et OBATON (1934), sur *Saprolegnia*.

Effet de l'extrait de malt et du malt à l'huile de foie de Morue sur le développement de *P. deliense*.

Le Champignon a été ensemencé, à 30°, sur de l'agar pur à 2%, de l'extrait de malt d'Orge de Kepler à 1%, 1.5%, 2% et sur de l'extrait de malt à l'huile de foie de Morue de Kepler (Burroughs Wellcome et Co, Londres); dans tous les cas on a ajouté 2% d'agar. Les dimensions des boîtes de Petri étaient 11 x 11 cm. L'examen a eu lieu après 48 heures.

Dans le cas de l'agar pur, la surface tout entière était recouverte par le Champignon, qui avait atteint les bords de la boîte. La rapidité de développement, de même que le caractère aérien de la culture, diminuent avec l'augmentation de la concentration de l'extrait de malt. Après 72 heures, les diamètres des colonies étaient, sur agar au malt à 1%, 1.5% et 2%, respectivement de 5.8, 3.0 et 2 cm.5. Sur agar au malt à 2 et 1.5% on a rencontré un certain nombre de corps ressemblant à des bourgeonnements (pl. II, fig. 19). Ces formations rappellent celles rencontrées chez *P. gracile*. C'est surtout sur malt-agar à 2% que ces corps étaient particulièrement nombreux et leur quantité allait en décroissant avec l'augmentation du pourcentage du malt. Sur malt-agar à 1%, où ils étaient en petit nombre, ils n'apparurent qu'après 72 heures, alors que l'on pouvait les rencontrer dès après 48 heures sur milieu à 2% et 1.5% de malt-agar.

Par contre, sur milieu à 1% de malt-agar, on avait un mycélium

aérien abondant, alors qu'il était rare sur milieu à 1.5% ou 2%. Le diamètre des colonies après 72 heures sur malt-agar à l'huile de foie de Morue à 2% était de 8 cm.8 et le développement avait un caractère moins aérien que sur malt-agar à 2%. Il est évident que l'huile de foie de Morue, qui contient également des vitamines, favorise la croissance du mycélium, qui perd toutefois son caractère aérien. Ceci a été confirmé par le fait que, lorsque l'on ajoute 0.5 gr de malt à l'huile de foie de Morue, à du malt-agar à 1.5%, le diamètre de la colonie passe de 3 cm.0 à 6.0, après 72 heures.

**Effet de la concentration en ions H sur la croissance du
Pythium deliense à 27°.**

LINOSSIER et ROUX (1890) ont été des premiers à signaler l'influence exercée par la réaction du milieu sur les Champignons. Etudiant la nutrition du Champignon du Muguet, ils ont constaté qu'il se développait abondamment sur milieux alcalins.

PELTIER (1912) a obtenu d'excellentes cultures de *Botrytis cinerea* Fr. sur milieux acides, alors qu'elles étaient médiocres sur milieux alcalins. Si l'acidité augmentait considérablement, le mycélium devenait stérile, tandis qu'avec une augmentation de l'alcalinité le nombre des sclérotas diminuait et celui des conidies augmentait.

ZELLER (1916), examinant quatre Champignons lignicoles, a montré que leur croissance était meilleure sur milieux acides que sur milieux alcalins.

GAGNEY (1916), dans ses études sur les *Actinomyces*, a trouvé que leur présence dans le sol est liée à un pH voisin de 6.

BRIGHTMAN, MEACHAM et ACREE (1920), avec *Endothia parasitica* (Murr.) Anders, ont trouvé que la germination commence à pH 2.6, est très peu active jusqu'à pH 4, où se manifeste un brusque maximum à pH 4.5, puis la courbe représentative forme un plateau jusqu'à pH 8 et s'annule à pH 8.5. L'étude attentive de la courbe permet de supposer l'existence d'un deuxième maximum vers pH 7.

En 1920, WAKSMAN et JOFFE ont apporté une confirmation aux résultats de GAGNEY.

En 1921, KARRER a montré que *Fusarium* sp. se développe de pH 2 à pH 9.2; *Colleotrichum Gossypii* Southw. de pH 3 à pH 9.2 et *Penicillium italicum* Wehmer de pH 2.5 à pH 8.

HOPKINS (1922) a cultivé *Gibberella Saubinetii* (Mout.) Sacc. sur une décoction de pomme de terre acidifiée et alcalinisée. Il obtint une courbe de croissance avec minimum bien défini situé, suivant le cas, entre pH 5.5 et pH 6.3.

KIRBY (1922 et 1925) a montré que *Ophiobolus graminis* Sacc. croissait le mieux sur milieux fortement alcalins.

EZEKIEL (1923), avec *Sclerotinia apothecia*, a rencontré un optimum à environ pH 2.5 ; le développement cesse à pH 7.7.

LEACH (1923) constate que *Colleotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Mag.) Br. et Cav. se développe mieux sur des milieux alcalins.

LINDFORS (1924) a étudié de nombreuses espèces de *Fusarium* et constaté un optimum de croissance du côté acide. Du côté de pH 7, il y a une baisse rapide de la courbe de croissance.

BOYLE (1925) a trouvé que *Fusarium* sp. croît de pH 3.4 à pH 10 sur milieu de Richard et de pH 2.2 à pH 8 sur décoction de pommes.

Les expériences de Mc KINNEY (1925) ont montré que la croissance de *Helminthosporium sativum* P.K. et B. est favorisée par un milieu neutre ou légèrement acide.

DAVIS (1926) a indiqué qu'un milieu neutre ou légèrement acide est très favorable à la croissance de *Ophiobolus graminis*, contrairement à ce qu'avait admis KIRBY (1922 et 1925).

COUCH (1932) a cultivé *Leptolegnia caudata* sur de l'eau, provenant d'un puits artésien, acidifiée par HCl ou alcalinisée par Na^2CO^3 et dont les pH allaient de 2.6 à 9.8 et il a constaté que la croissance était bonne dans toutes les solutions dont les pH allaient de 9 à 3 environ, médiocre et invisible à l'œil sur milieu à pH 2.6.

Sur un milieu constitué par du maltose à 0.5% avec de la peptone à 0.1% et de l'agar à 2% acidifié par une solution normale de PO^4H^3 , la croissance du Champignon se ralentit à mesure que le pH augmente, jusqu'à une chute brusque du développement à pH 4.6, alors que dans les cultures à pH 4.5 et 4.4 la croissance repart avec la même rapidité qu'à pH 5.0.

DENNIS (1933) a trouvé un optimum pour *Helminthosporium avenae* Eidano à pH 6, et donc du côté acide ; une croissance assez bonne étant obtenue entre pH 5 et pH 6.75.

SINGH (1933) a étudié *Cercospora dolichi* E. et E. et trouvé, sur

une gamme de pH allant de 3.3 à 8.1, deux maxima, l'un à 4.6 et l'autre à 7.1; il en conclut que ce Champignon réclame pour sa croissance soit un milieu acide, soit un milieu légèrement alcalin.

MITRA ET MEHTA (1934) ont trouvé, pour *Helminthosporium nodulosum* B. et C., cultivé sur milieu de Richard modifié, un maximum à pH 5.5 et un autre à pH 7.1 et un minimum à pH 6.3. Il n'y avait aucun développement à pH 2.1 et à pH 8.5. Avec *H. leucostylum* Drech. les maxima étaient à pH 5.5 et 6.7, avec un minimum à pH 6; il n'y avait aucune croissance à pH 3.0 et 8.5.

Personnellement nous avons effectué nos cultures sur des milieux acidifiés ou alcalinisés respectivement par addition de HCl ou de Na^2CO^3 (farine de Maïs à 1.5 % avec agar pur à 2 %), à la température de 27° C. La culture destinée à procurer le matériel de repiquage était elle-même maintenue à la température de 27° sur agar farine de Maïs. Le prélèvement était fait après 48 heures et à la périphérie de la culture, de manière à entraîner de jeunes hyphes. La dimension des boîtes de Petri était de 14 cm.5 sur 2.5. Les expériences étaient effectuées sur trois lots et les résultats rapportés ci-dessous sont les moyennes de six lectures. Avant l'ensemencement, les boîtes préparées étaient elles-mêmes maintenues à la température de 27°. Le pH a été évalué par la méthode électrométrique de la manière suivante. Dans chaque cas on prenait deux flacons renfermant l'un 150 cc. d'extrait de farine de Maïs à 1.50 %, l'autre 150 cc. du même extrait avec 2 % d'agar. On ajoutait à chacun la même quantité de HCl ou de $\text{Na}^2 \text{CO}^3$, et on stérilisait à l'autoclave. Le contenu du second flacon a été réparti également entre 3 boîtes de Petri qui furentensemencées ensuite. Le pH de l'autre flacon a été déterminé électrométriquement, ce qui donne en même temps celui du second, car on sait que l'addition d'agar ne change pas cette valeur (CLARK et LUBS, 1917). Lorsque le pH du milieu descend en dessous de 2.9 et 2.6, le milieu ne prend pas et, en conséquence, il n'est pas possible de poursuivre d'expériences à un pH inférieur à 2.9. Le pH de l'extrait de farine de Maïs seul est de 6.2.

La figure 4 montre très clairement qu'il n'y a qu'une croissance faible sur des milieux dont le pH est bas, mais qu'elle augmente à

mesure que l'acidité diminue, jusqu'à être parfaite avec un pH égal à 5. Le développement est moindre ensuite jusqu'à pH 7, pour augmenter alors avec l'alcalinité et l'optimum se place à environ pH 9, où la croissance est encore plus active qu'au premier optimum. Une augmentation de l'alcalinité retarde la croissance journalière

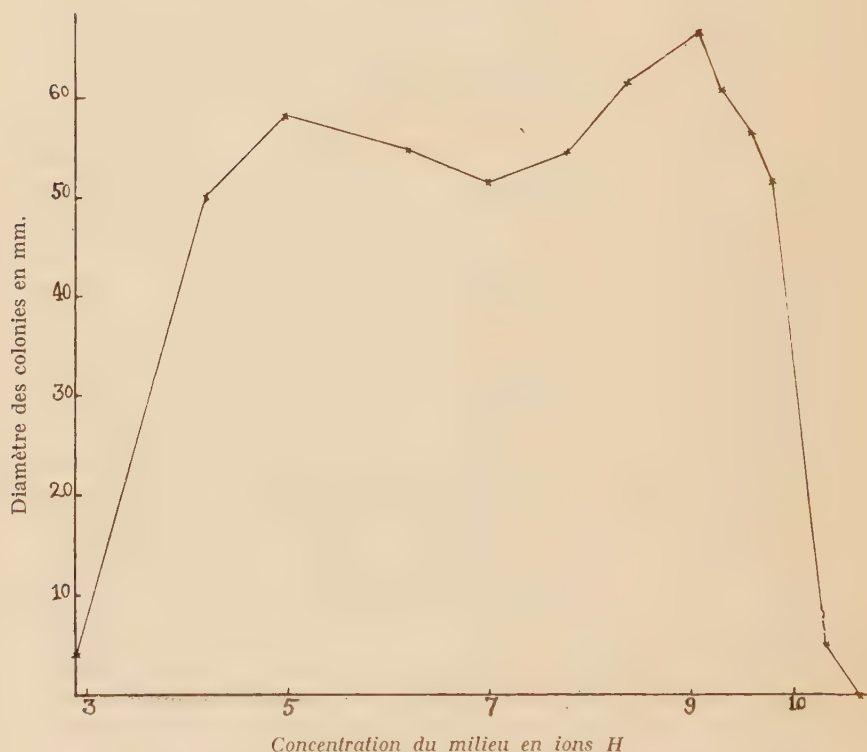


Fig. 4. — Courbe de croissance de *Pythium deliense* durant le deuxième jour à 27°C, à différents pH.

et il y a une chute brusque de la courbe à partir de pH 9.8, jusque pH 10.6, où la croissance s'arrête. Ainsi donc l'alcalinité, dans certaines limites, favorise le développement de ce Champignon, mieux que l'acidité.

Le caractère de la croissance à des valeurs du pH hautes ou basses est le même. Le mycélium est peu abondant, non compact et ne peut être distingué que difficilement.

On a constaté, d'une façon générale, ainsi que le montrent les résultats rapportés au début de ce chapitre, que les Champignons se développent mieux sur des milieux acidifiés légèrement, c'est le cas par exemple pour *Botrytis cinerea* (PELTIER), *Fusarium* sp. (LINDFORS), *Helminthosporium avenae* Eidano (DENNIS) et *H. leucostilum* (MITRA et MEHTA). Cependant l'inverse est également vrai, c'est le cas du Champignon du Muguet (LIHOSSIER et ROUX), de *Colleotrichum lindemuthianum* (LEACH), ce dernier modifie le milieu sur lequel il est placé qui, étant acide, devient alcalin. *Cercospora dolichi* (SINGH) et *H. nodulosum* (MITRA et MEHTA) montrent aussi une légère préférence pour un milieu alcalin. Il en va de même pour *P. deliense*, qui a son optimum de croissance à pH 9 environ et manifeste une préférence nette pour les milieux alcalins. En réalité *P. deliense* a deux maxima, l'un à pH 5 et l'autre à pH 9, avec un minimum à pH 7. De fait il est de nombreux Champignons qui ont eux aussi deux maxima, c'est ce qui a lieu avec *Cercospora dolichi*, par exemple, et avec *Helminthosporium nodulosum* (MITRA et MEHTA).

Chez *P. deliense*, le développement est vraiment très faible quand le milieu est ou trop acide (pH 2.9) ou trop alcalin (pH 10.3) et le développement s'arrête à pH 10.6. Par ces caractères il est comparable aux espèces d'*Helminthosporium* étudiées par MITRA et MEHTA. Ces derniers auteurs ont constaté l'absence de développement à pH 2.1 et pH 8.5 pour *H. nodulosum* et à pH 3.0 et 8.5 pour *H. leucostylum*.

En résumé, *P. deliense* réclame pour son développement optimum, soit un milieu légèrement acide, soit un milieu alcalin.

CHAPITRE II. — ORGANES SEXUELS

Influence des conditions externes sur la reproduction sexuelle.

Nous étudierons en premier lieu la température, ensuite le pH, puis la lumière et l'obscurité, l'absence d'oxygène et, enfin, diverses substances nutritives.

A. — Effet de la température.

Chez *Pythium deliense*, cultivé sur farine de Maïs-agar, les organes sexuels se développent rapidement aux températures allant de 25 à 35°C. Aux températures très élevées, comme aux températures très basses, ces organes n'ont pas été obtenus, même après 120 heures. L'optimum est entre 30 et 35°.

TEMPÉRATURE	TEMPS APRÈS LESQUELS SONT APPARUS LES ORGANES SEXUELS, SUR MILIEU A LA FARINE DE MAIS-AGAR A 1.5 %
40°C	pas d'organes sexuels.
38°C	pas d'organes sexuels.
35°C	apparition après environ 12 à 18 heures.
30°C	apparition après environ 12 à 18 heures.
25°C	apparition après environ 27 à 30 heures.
20°C	apparition après environ 55 heures.
15°C	pas d'organes sexuels.
10°C	pas d'organes sexuels.

Pour les autres Champignons ces durées, à 30° et sur les mêmes milieux, ont été pour :

Pythium mamillatum : environ 48 heures.

Pythium de Baryanum : environ 72 heures.

Pythium indigoferae : environ 96 heures.

Aux températures inférieures à 30°, soit 25 ou 20°, ces mêmes organes apparaissent d'abord chez *P. deliense*, puis chez *P. de Barryanum*, ensuite chez *P. mamillatum*, enfin chez *P. indigoferae*. On peut ranger les Champignons dans le même ordre décroissant quant à la production *quantitative* des organes sexuels.

A titre de comparaison nous rappellerons que, chez *Leptolegnia caudata*, COUCH (1932) a constaté qu'à haute température (27-35°C) la formation des organes sexuels est complètement empêchée.

B. — Effet du pH du milieu sur la formation des organes sexuels chez *Pythium deliense*.

On sait, depuis PELTIER (1912), que chez *Botrytis cinerea* Fr. le mycélium devient stérile quand l'acidité du milieu s'accroît considérablement, tandis qu'avec une alcalinité forte les sclérotés diminuent et que les conidies augmentent. BACH (1925, p. 184), étudiant *Aspergillus repens* de Bary, a constaté que « les périthèces ne peuvent évoluer qu'au contact d'un milieu moins acide que pH 3.6. La formation des conidies est entravée par les milieux très acides (pH 3.) Les milieux neutres ou alcalins ont, sur leur apparition, une action nettement favorisante ».

COUCH (1932) a cultivé *Leptolegnia caudata* sur de l'eau provenant d'un puits artésien, qu'il acidifiait ou alcalinisait, et il a trouvé que sur les milieux à pH 5 et 7 il se formait un très grand nombre d'oogones dans certaines cultures, tandis qu'il y en avait peu dans une culture à pH 4.2 et pas du tout sur des milieux ayant d'autres pH.

De nombreux auteurs ont essayé de faire germer des spores de Champignons sur des milieux à pH très divers et montré combien ce facteur d'acidité importait dans le phénomène. C'est ainsi que DOSDALL (1923), expérimentant avec des spores d'*Helminthosporium sativum*, conclut que les spores germent mieux sur des solutions alcalines que sur des solutions acides et qu'elles supportent même un haut degré d'alcalinité.

MITRA et MEHTA (1934), sur *Helminthosporium nodulosum*, ont indiqué que les spores tolèrent une large échelle de pH allant de pH 3.8 à pH 10, l'optimum étant placé entre 6.5 et 6.9.

Nous avons, de notre côté, essayé de déterminer l'action

exercée par l'acidité du milieu sur la croissance de *P. deliense* et nous avons consigné les résultats de nos expériences dans le tableau suivant :

Tableau indiquant la formation ou l'absence d'organes sexuels par P. deliense, en même temps que la durée nécessaire à leur apparition, à des pH divers et à la température de 27°C.

pH	PRÉSENCE OU ABSENCE D'ORGANES SEXUELS ET TEMPS DE FORMATION.
2.9	Pas d'organes sexuels après 48 heures ; ils apparaissent après environ 100 heures.
4.2	Peu d'organes sexuels après 24 heures.
5.0	Nombreux organes sexuels après 24 heures.
6.2	Quelques organes sexuels après 24 heures.
7.0	Très peu d'organes, le plus petit nombre rencontré, après 24 heures.
7.8	Quelques organes, après 24 heures.
8.4	Assez nombreux organes en 24 heures.
9.1	
9.2	
9.6	
9.8	Quelques organes en 24 heures.
10.3	Pas d'organes en 24 heures, ni même après 100 heures.
10.6	Pas d'organes en 24 heures, ni même après 100 heures.

On peut voir, par le tableau qui précède, combien le pH du milieu influe sur la formation des organes sexuels. A pH 4.2 et 9.8 il s'en forme peu, mais à pH 2.9 et 10.3 il n'en apparaît pas du tout, même après 4 jours. Le plus petit nombre a été rencontré à pH 7, tandis que des pH comme 8.4 à 9.6 sont favorables et que, du côté alcalin, le temps nécessaire pour leur formation est encore comparativement moindre qu'à pH 5.0.

Bref, j'ai constaté que, pour la formation des organes sexuels de ce Champignon, des milieux alcalins ou acides peuvent être propices, mais que le végétal manifestait une préférence pour les milieux alcalins. De toute façon, une acidité trop grande, et *vice versa*, retarde, puis arrête, la formation des organes sexuels. On peut ainsi le comparer à *Leptolegnia* (COUCH) puisque chez celui-ci, également, la formation des organes sexuels est arrêtée sur des milieux dont la

concentration en ions H est trop élevée : 3.8, 3.6, etc. Mais chez *Leptolegnia* il n'apparaît pas d'organes sexuels sur des milieux alcalins, tandis que *P. deliense* en forme de préférence dans ces conditions.

C. — Effet de la lumière et de l'obscurité.

Les quatre Champignons ont été ensemencés en boîte de Petri sur agar à la farine de Maïs et sur Carotte. La moitié de ces boîtes, pour chaque Champignon, a été enveloppée dans du papier noir, l'autre moitié demeurant à découvert. Les boîtes furent portées dans la chambre noire, éclairée par une lampe Osram de 200 w. qui brûlait nuit et jour. L'examen des boîtes eut lieu 5 jours après et on trouva, dans toutes, des organes reproducteurs. La température de la pièce était d'environ 25 à 27°.

Les mêmes expériences ont été reprises, après suppression de la source lumineuse ; dans ce cas encore les organes sexuels se sont formés.

On a prélevé des fragments du mycélium aérien de *P. deliense* cultivé sur Pomme de terre, et on les a portés sur solution de Petri, dans de petites boîtes de Petri qui furent ensuite exposées à la lumière solaire directe de 7 h. à 18 h. ; la température oscillant entre 25 et 32°. Cette fois encore on obtint la formation d'organes reproducteurs.

Il est ainsi prouvé que ni la lumière, ni l'obscurité, n'arrêtent la formation des organes sexuels et ceci concorde avec les résultats de COUCH (1932) sur *Leptolegnia caudata*. Le même auteur a, néanmoins, montré que ces facteurs entraient en jeu chez certains Champignons aquatiques, tel *Aphanomyces exoparasiticus* (1926).

D. — Effet du manque d'oxygène.

Dans un dessiccateur ordinaire, de contenance d'environ 2 litres, on place 22 gr. d'acide pyrogallique sec auxquels on ajoute 350 cc. d'une solution de soude à 1% (JORDAN, 1920). On place de petites boîtes de Petri ensemencées (milieu à l'agar-farine de Maïs) à l'intérieur de ce dessiccateur et l'on lute à la vaseline et à la cire. On prépare, en même temps, des témoins, qui ne sont pas placés à l'intérieur du dessiccateur. L'examen a lieu 6 jours plus tard ; on constate la formation d'organes reproducteurs chez les témoins et

leur absence chez les autres. On retire alors quelques-uns de ceux-ci du dessiccateur et on les laisse pendant plusieurs jours à l'air libre ; il se forme, durant ce temps, des organes sexuels sur le mycélium de nouvelle formation. On voit ainsi, très nettement, que pour les 4 Champignons, l'oxygène est un facteur indispensable pour la formation des organes reproducteurs.

Lorsqu'un mycélium aérien s'est développé il a toujours été plus abondant chez les témoins. En l'absence d'oxygène, le mycélium développé demeure mince et on rencontre, parfois, des gouttelettes d'eau adhérentes aux hyphes et ayant l'aspect de gouttes de rosée, dont elles présentent l'éclat.

E. — Effet de substances nutritives diverses.

Les 4 Champignons ont été cultivés sur milieux divers à 30° et on trouvera, résumés dans le tableau ci-dessous, les résultats quant à la production d'organes sexuels sur les différents milieux.

	MILIEUX							
	I	II	III	IV	V	XI	XII	LII
<i>P. deliense.</i>	+	+	+	+	+	+	+	—
<i>P. de Baryanum.</i>	+	+	+	+	+	+	+	—
<i>P. mamillatum.</i>	+	+	+	+	+	—	+	—
<i>P. indigoferae.</i>	1 ou 2	—	—	+	1 ou 2	—	+	—

On voit ainsi que, sur solution peptonée à 1%, aucun des Champignons étudiés n'a formé d'organes reproducteurs. Sur agar pur, farine de Maïs, sur Soja-agar et sur Carotte il y a eu, par contre, formation d'organes sexuels. SIDERIS rapporte qu'il lui a été possible d'obtenir des organes sexués de *P. indigoferae* sur agar aux graines de Melon d'eau ; personnellement nous n'avons pu obtenir de tels résultats, bien que les milieux aient été préparés en suivant toutes les indications de cet auteur. Il est vrai qu'il règne une certaine incertitude sur l'identité des graines utilisées par lui, qu'il désigne sous le nom de *Cucumis citrullus*, alors que WILLIS (1925) leur donne le nom de *Citrullus vulgaris* Schrad. On a généralement admis et c'est là, entre autres, l'opinion de GWYNNE-VAUGHAN et BARNES (1927, page 40) que, d'une façon générale les milieux

riches en substances nutritives sont favorables au développement végétatif des Champignons, mais non à la production d'organes sexués. Or, la farine de Maïs et celle d'Avoine (Mc'Gregor Robertson) sont riches en substances nutritives et favorables à la croissance et, cependant, sur ces milieux tous nos Champignons ont donné des organes sexués, tandis que sur agar à la farine d'Avoine *P. indigoferae* seul n'en a pas produit. D'autre part SIDERIS (1931) a pu montrer que les constituants azotés et lipidiques doivent exister à une concentration relativement élevée, par rapport aux glucides, pour qu'il y ait reproduction sexuelle normale chez *Nematosporangium*. Et, cependant, nous avons vu tous nos Champignons produire des organes sexuels sur agar pur, qui est de faible valeur nutritive. Ceci montre combien il est difficile de généraliser, en ce qui concerne les exigences physiologiques de tels Champignons, pour la formation de leurs organes reproducteurs.

P. de Baryanum n'a pas donné d'organes sexuels sur le Pois, mais sur le Haricot on a pu en obtenir quelques-uns.

P. mamillatum n'a pas formé d'organes reproducteurs sur les plantules de Concombre, il en a, par contre, donné sur la Betterave (racines et plantules). On a pratiqué de la façon suivante : des plantules vivantes, lavées à l'eau distillée, ont été placées avec un peu d'eau distillée dans des verres de montre stérilisés et ensuite infectées par le Champignon. Après quelques jours la plantule tout entière était envahie par le mycélium, qui avait même gagné l'eau. Des organes sexuels se sont formés tant sur le substratum que sur le mycélium aquatique.

P. indigoferae est épiphyte sur les feuilles d'*Indigofera erecta* Hochst et BUTLER, en 1907, l'a cultivé sur des rameaux bouillis de cette même plante, dans l'eau. Le Champignon n'a pas produit d'organes sexuels sur feuilles et rameaux, passés à l'eau bouillante et stérilisés, d'*Indigofera enneaphylla* et d'*Indigofera lignifolia*. Sur Gourde, sur racine d'*Abutilon indicum* et sur plantules de Cresson il s'est formé des organes sexuels, mais on n'a pu en obtenir sur Pomme de terre, plantules de Concombre, Pois et Haricot.

Le cas du *P. deliense* est un peu particulier. D'ordinaire les zoospores ou les sporanges ne se forment que sur les milieux indiqués plus loin (cf. page 52). Sur tous les milieux solides, sauf les

milieux X, XVIII, XXXIV, XXXV, XXXVI, XXXIX, XL, XLI et XLIX, il y a formation d'organes sexuels. Sur Pomme de terre, graines de Ricin, Pois et Haricot les organes sexuels ne se forment pas pendant un assez long temps, par contre le développement végétatif est très riche. Ce n'est qu'après quelque temps que l'on voit apparaître un ou deux organes reproducteurs.

Sur milieu liquide les organes sexuels ne se forment d'ordinaire pas, sauf sur les milieux XLV, XLVI, LIV, LV et LIX.

Sur tissus animaux il y eut formation d'organes sexués, même sur le mycélium aquatique développé sur les Fourmis et les Scolopendres.

(I) *Action de la peptone.* — Sur bacto-peptone on obtient les organes sexuels jusqu'à la concentration de 0.3% (avec addition de 2% d'agar), mais sur peptone (poudre sèche de viande) cette formation s'arrête déjà à la concentration de 0.25%. D'autre part, si l'on utilise des solutions maltosées à 0,5-1% on obtient des organes sexuels, mais ceux-ci ne se forment pas si l'on emploie la même solution additionnée de 0.1% de peptone.

(II) *Action des sucres.* — Les trois sucres étudiés sont : le saccharose, le maltose et le glucose. A chaque solution on ajoute, dans l'agar, 0.1% de peptone sèche.

Avec le saccharose on a des organes sexuels, les concentrations allant de 0.5 à 10%. Sur maltose on en a quelques-uns, jusqu'à la concentration de 7%, mais au delà ils diminuent en nombre, et à 10% il ne s'en forme plus. Avec le glucose on n'en rencontre pas, même lorsque la concentration est inférieure à 7%. On voit ainsi que, si des concentrations trop fortes en maltose retardent la formation des organes sexuels, le glucose est encore plus inhibiteur, tandis que le saccharose ne paraît pas avoir d'effet notable.

(III) *Action du malt d'Orge et du malt à l'huile de foie de Morue.* — Nous avons consigné les principaux résultats de cette étude dans le tableau suivant :

MILIEUX	ORGANES SEXUELS	TEMPS DE FORMATION
Agar pur à 2 %.....	présents	24-48 heures
Malt-agar à 0.5 %.....	quelques-uns	48-72 heures
Malt-agar à 1.0 %.....	très peu	48-72 heures
Malt-agar à 1.5 %.....	aucun après	96 heures
1.5 % malt-agar additionné de 0.5 % de malt à l'huile de foie de Morue.....	présents	72-96 heures
1.5 % malt-agar + malt à l'huile de foie de Morue à 2 %.....	présents	48-72 heures

On voit ainsi combien l'addition d'huile de foie de Morue est favorable au développement des organes sexuels. Par contre, un trop fort pourcentage d'Orge est une cause très nette de retard.

IV. *Effet de certains sels.* — Nous nous sommes proposé de rechercher quels sels étaient nécessaires à la formation des organes sexuels, mais toutes nos expériences ont échoué. En effet, ces organes se forment tantôt sur des milieux très pauvres en substances nutritives, tel celui à l'agar, tantôt sur des milieux particulièrement riches en ces substances, comme les milieux à l'agar-farine d'Avoine ou de Maïs. Et si nous avons pu constater que l'absence des sels d'ammonium ralentit le développement, de même la formation des organes sexuels est-elle beaucoup plus lente en l'absence de NH_4NO_3 ; ceux-ci n'apparaissent, en effet, qu'après 72 heures.

CHAPITRE III. — ACTION HYDROLYTIQUE

BUTKEWITSCH (1903) a montré qu'avec la peptone l'*Aspergillus niger* provoque la formation, par hydrolyse presque complète, d'une énorme quantité d'ammoniaque, qui n'alcalinise pas cependant le milieu, car elle est neutralisée par la formation d'une quantité équivalente d'acide oxalique. Mais le *Penicillium glaucum* et les Mucors, qui ne produisent pas d'acide oxalique, ne donnent pas non plus d'ammoniaque. Ces Champignons s'arrêtent au stade amino-acide et ne donnent que peu d'ammoniaque. La production de ce corps à partir de la peptone est l'œuvre d'une exodiastase.

WAKSMAN et JOFFE (1920), examinant les *Actinomyces*, ont montré que le milieu à base de peptone s'alcalinise généralement. Ces résultats ont été confirmés en 1923 par NAESSLUNG et DERNBY. La même année, KLOTZ a constaté une production considérable d'ammoniaque par l'*Aspergillus niger* consommant de la peptone en l'absence de sucre. Suivant que la production d'acides, comme l'acide oxalique, neutralise plus ou moins cette ammoniaque, la réaction se maintient plus ou moins près de la neutralité. Il n'a pas vu la réaction aller au delà de pH 6.5. Avec *Diplodia natalensis* le milieu peptoné s'alcalinise d'une façon régulière dès le début ; l'alcalinisation atteint pH 8.4. *Phoma betae* et *Sphaeropsis malorum* se comportent à peu près de même.

BACH (1925, p. 168), dans son étude sur *Aspergillus repens* de Bary, a montré que la peptone n'alcalinise qu'en l'absence de toute source de carbone. Dans ce cas les amino-acides issus de cette hydrolyse ont leur chaîne carbonée utilisée en plus grande proportion que leur azote, qui s'accumule à l'état d'ammoniaque. Le pH d'une solution de peptone Difco à 5% passe de 6.2 à 8.2 à la fin du 6^e jour, pour diminuer ensuite, jusqu'à atteindre un plateau à pH

6.8, à la fin du 22^e jour. Cette acidification est due à la formation d'une grande quantité d'acide oxalique.

VOLKONSKY (1933) avec *Saprolegnia dioica* a constaté qu'en présence de peptone, comme seul aliment organique, le pH des cultures, quelle que soit sa valeur initiale, tend d'abord vers la neutralité, puis s'élève, dans les cultures âgées, jusqu'à des valeurs de pH égales à 7.6-7.8.

Pour évaluer l'activité hydrolytique des quatre Champignons on a prélevé, sur des cultures de 48 heures maintenues à la température de 30°C, des fragments, de taille aussi comparable que possible, qui ont été repiqués sur des solutions diverses, en flacons Pyrex de 200 cc., renfermant 100 cc. de la solution à étudier, préparée à la concentration de 1%.

A. — *Hydrolyse de la peptone.* — On a utilisé la peptone de Merck. Quant à la rapidité de la croissance, comme à la quantité de mycélium formé sur ce milieu, *P. deliense* vient en tête, puis *P. de Baryanum* et *P. mamillatum* et, enfin, *P. indigoferae*. Dans le cas des trois premiers, il se forme un mycélium gélatineux blanchâtre à la surface du liquide. Chez *P. indigoferae* le développement est lent et le mycélium demeure en dessous de la surface du liquide. Nous avons évalué le pH du milieu électrométriquement tous les 7 jours et obtenu les diverses valeurs suivantes, en partant d'un pH initial de 5.07.

APRÈS	<i>P. deliense</i>	<i>P. de Baryanum</i>	<i>P. mamillatum</i>	<i>P. indigoferae</i>
7 jours....	pH 6.70	5.51	5.20	5.08
14 jours....	8.06	7.40	7.03	5.19
21 jours....	8.30	7.92	7.88	6.01

L'activité hydrolytique du *P. deliense* est très marquée jusqu'à la fin de la première semaine ; elle commence à décliner et à devenir faible après la troisième semaine. Par contre, celle de *P. de Baryanum* et de *P. mamillatum* est peu marquée jusqu'à la fin de la première semaine, elle est plus forte durant la seconde et redevient faible pendant la troisième. *P. de Baryanum* est plus actif pendant la première semaine, mais il l'est moins durant la troisième que *P. mamil-*

latum. Dans le cas de *P. indigoferae*, il y a peu de modifications jusqu'après 15 jours, mais ensuite l'activité hydrolytique augmente, sans que jamais la valeur du pH descende au-dessous de 6, même à la fin de la troisième semaine.

La réaction qui s'effectue paraît être la même dans les trois cas ;

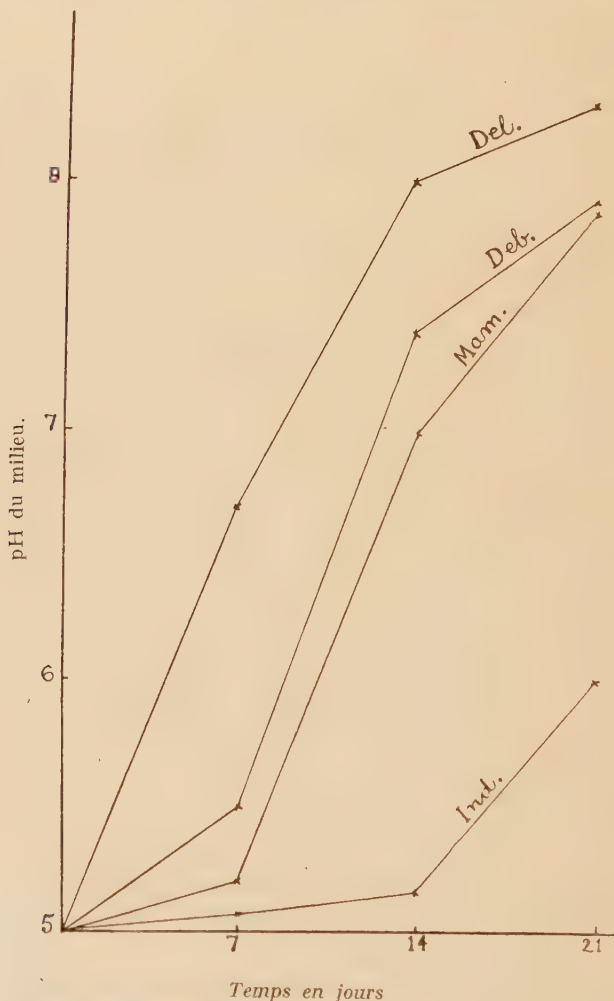


Fig. 5. — Courbe montrant les changements de la concentration en ions H de la peptone à 1 % par suite du développement des Champignons, à 30° C. Deb. = *Pythium de Baryanum*; Del. = *P. deliense*; Mam. = *P. mamillatum*; Ind = *P. indigoferae*.

elle ne varie que d'intensité et ceci dans l'ordre décroissant suivant : *P. deliense*, de *Baryanum*, *mamillatum* et *indigoferae*.

Les Champignons secrètent une enzyme protéolytique qui hydrolyse presque complètement la peptone avec production d'ammoniaque, avec un stade amino-acide intermédiaire. L'ammoniaque alcalinise le milieu. Après 21 jours un examen a montré que, avec tous les Champignons, sauf *P. indigoferae*, la peptone a subi une hydrolyse très poussée, ceci dans l'ordre ascendant suivant : *P. mamillatum*, de *Baryanum* et *deliense*. Un examen au tournesol a permis de constater que les solutions peptonées sur lesquelles étaient cultivés *P. deliense*, *P. de Baryanum* et *mamillatum* sont fortement alcalines, tandis que, avec *P. indigoferae*, la solution est légèrement acide. En aucun cas il ne s'est formé d'acide oxalique.

En ce qui concerne l'alcalinisation de la solution peptonée *P. deliense*, de *Baryanum* et *mamillatum* sont comparables à *Saprolegnia dioica*, *Diplodia natalensis*, *Phoma betae* ou *Sphaeropsis malorum*. Dans ce cas, par suite de la production abondante d'ammoniaque à partir de la peptone, les milieux deviennent alcalins et leur pH dépasse de beaucoup le point de neutralité.

P. indigoferae, par contre, ressemble à *Penicillium glaucum* et aux Mucors qui ne donnent que peu d'ammoniaque.

B. — *Hydrolyse des glucides*. — Les Champignons ont été placés sur des solutions de saccharose à 1% ou d'amidon soluble à 1%, à 30°C, pendant 7 jours. Le repiquage a eu lieu à partir de cultures sur agar-farine de Maïs.

Avec les solutions de saccharose, il n'a pas été possible d'obtenir le développement de *P. de Baryanum*, *P. mamillatum* ou de *P. indigoferae*. *P. deliense* a donné quelques hyphes. A l'analyse, la solution a montré l'existence d'alcool et de CO² en très petites quantités. Il n'y avait pas trace de sucre interverti. Il semble que l'on soit en présence d'une véritable fermentation alcoolique. On rappellera ici que BACH (1925, p. 39), chez *Aspergillus repens* de Bary, a montré que « la majeure partie du saccharose, à la fin de la culture, est intervertie, grâce à l'invertine produite par le Champignon ».

Sur amidon, tous les Champignons se sont parfaitement développés et la plus faible croissance a été réalisée par *P. indigoferae*. Dans tous les cas les solutions ont réduit la liqueur de Fehling et les

Champignons se classent dans l'ordre suivant, quant à l'intensité de cette réduction : *P. deliense*, *P. de Baryanum*, *P. mamillatum* et *P. indigoferae*. Les solutions ne réduisent pas l'acétate de cuivre en solution acétique, ce qui indique la présence de dextrines ou d'amylose ou de maltose ou de toutes ces substances, mais non celle de glucose ou de fructose. C'est avec *P. indigoferae* que l'on a obtenu la plus forte hydrolyse. De ces expériences on peut conclure que les Champignons sécrètent une diastase, qui n'est certainement pas de l'invertase, et que l'intensité de la réaction est du même ordre que pour la peptone.

C. — *Extraction de l'enzyme.* — On a cultivé *P. deliense* dans de grands flacons renfermant une solution amylacée pendant 7 jours. Le mycélium, du poids de 6 gr. 2, a été lavé dans l'eau distillée et ensuite mis à macérer dans une solution à 10% de NaCl pur dans l'eau distillée à la température ordinaire (20°C) pendant 24 heures, puis en incubation à 27°, pendant les 24 heures suivantes. La solution a été filtrée et le filtrat soumis à la dialyse à la glacière (avec addition de quelques gouttes de toluène pour éviter la putréfaction) jusqu'à ce qu'il ne soit plus possible de déceler de NaCl dans la liqueur mère. Ceci a pris environ une semaine. Par traitement d'une petite portion de la liqueur mère à l'alcool absolu on a eu un léger trouble, ce qui prouve que le ferment n'est présent qu'à l'état de traces et qu'il serait inutile de tenter de l'isoler. Aussi a-t-on eu recours à la méthode suivante pour le mettre en évidence.

On ajoute 25 cc. de la liqueur mère à 50 cc. d'une solution d'amidon à 2% et le mélange est placé, après addition de quelques gouttes de toluène, à la température de 37° et abandonné durant 48 heures. Après ce temps, on traite la solution par la liqueur de Fehling et par une solution acétique d'acétate de cuivre. Toutes deux sont légèrement réduites, la première plus que la seconde, ce qui montre la présence de glucose et l'existence d'une diastase et, par déduction, d'invertase, dans le Champignon, au moins à l'état de traces.

D. — *Rapidité comparée de l'hydrolyse.* — Les Champignons ont été cette fois cultivés sur une solution d'amidon à l'agar (amidon soluble 2% et agar 2%) et aussi sur farine de Maïs (1.5%) additionnée d'amidon soluble (2%) et d'agar (2%), dans des boîtes de

Petri de 14 cm.5 sur 2 cm.5. Chaque boîte a reçu 50 cc. de liquide. Les expériences ont été effectuées en triple. Dans tous les cas la croissance dura 48 heures. Après ce temps, on versa, sur le milieu, une solution iodée destinée à mettre en évidence l'amidon. Dans un des lots on laissa cette solution agir durant une minute et durant 10 minutes dans les autres. On rejeta ensuite cette solution iodée et on lava la surface du milieu à l'eau distillée.

Les zones où une hydrolyse complète s'était effectuée apparaissent en blanc sur les photographies (pl. VII) et en noir celles où il ne s'est pas produit d'hydrolyse. A l'intérieur des boîtes, les premières semblent incolores, sauf là où le mycélium a pris une légère teinte brune par suite de l'action de l'iode. Ces zones claires, tout autour du point d'ensemencement, montrent la disparition de l'amidon et sa transformation en maltose et achrodextrine. A cette zone centrale fait suite, généralement, une bande teintée en pourpre qui indique la formation d'un produit d'hydrolyse intermédiaire, telle que l'érythrodextrine (PELTIER, 1921), et qui ménage le passage à une zone d'un bleu clair, suivie elle-même d'une autre d'un bleu foncé. Nous avons à plusieurs reprises essayé de constater si l'hydrolyse s'effectuait au delà de la colonie, rappelant le phénomène constaté par PELTIER (1921) chez *Pseudomonas Citri*, mais toujours nous avons pu nous rendre compte que l'hydrolyse ne s'effectuait qu'en deçà des zones de croissance.

Il nous a paru que le Champignon tirait ses substances nutritives des régions situées en deçà des zones de croissance, ce qui expliquerait qu'il n'y a pas d'hydrolyse dans les parties en développement de la colonie. Pour vérifier le bien-fondé de cette opinion, nous avons institué deux séries d'expériences. Dans une première série, nous avons placé 25 cc. seulement d'agar-farine de Maïs par boîte de Petri (14 cm. sur 2.5), afin qu'il n'y ait qu'une mince couche de milieu nutritif, et dans une autre série nous avons mis 40 cc. de liquide par boîte, maintenue inclinée, de manière à ménager des épaisseurs variables. On a procédé ensuite à l'ensemencement avec des souches provenant des quatre sortes de Champignons. Pour chaque sorte, la moitié des boîtes a été traitée à l'iode après 24 et après 48 heures. Comme, dans la première série, la quantité de substance disponible était restreinte, on pouvait penser que dès que cette quantité aurait été utilisée par les hyphes du centre il se

produirait une hydrolyse en avant de la colonie, afin de procurer des aliments aux parties en voie de croissance. On espérait obtenir, dans l'autre lot, des résultats comparables, là où le milieu n'avait été répandu que sur une mince épaisseur. Mais, dans tous les cas, il n'est pas apparu qu'il y ait hydrolyse dans les portions avancées des colonies.

Toutes ces expériences montrent que les zones d'hydrolyse sont de moins en moins étendues à mesure que l'on pénètre à l'intérieur du milieu, étant plus grandes par conséquent à la superficie que dans le fond (fig. 6).

Quand on fait agir la solution iodée pendant une minute environ, les Champignons ne sont pas lésés et continuent à se

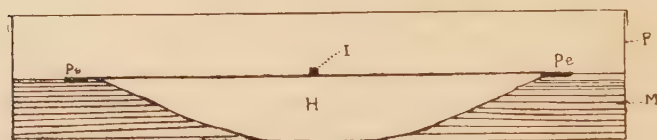


Fig. 6. — Section schématique d'une boîte de Petri montrant l'hydrolyse. Le milieu a été traité avec la solution iodo-iodurée après 48 heures de croissance du *Pythium deliense* à 30°C. I = fragment ensemençé; P=boîte de Petri; M=milieu nutritif; H=portion du milieu hydrolysée; Pe=périphérie de la colonie.

développer et la coloration légèrement bleue, prise par le milieu, disparaît après 12 heures, progressivement.

On peut voir sur la planche VII les photographies des milieux où se sont développés les quatre Champignons. Elles indiquent les zones d'hydrolyse comparées, aux températures de 20°, 30° et 35°. On n'a pas reproduit ici, intentionnellement, celles obtenues à la température de 25°, car elles n'avaient rien de particulier.

On peut voir (fig. 1 du texte) que, à la température de 20°, la croissance de *P. indigoferae* est nettement moindre que celle de *P. deliense*; par contre on constate, en examinant la pl. VII, que l'activité hydrolytique de ce dernier Champignon est beaucoup moins marquée que celle du premier. Chez *P. deliense*, la zone centrale n'est pas hydrolysée entièrement. A 20°, c'est *P. de Barryanum* qui manifeste la plus forte activité hydrolytique. Ceci est

vrai aussi, d'ailleurs, de sa croissance à la même température (fig. 1 du texte).

A 35°, seul *P. deliense* paraît se développer, et c'est ce qui explique l'absence des zones d'hydrolyse sur les photographies. *P. deliense* manifeste une activité hydrolytique très grande à 30 et 35° qui va de pair avec sa croissance. Il peut se développer encore à 40° et ici encore, bien que son activité hydrolytique soit moins marquée et sa croissance pareillement ralentie, il apparaît une zone blanchâtre tout autour du point d'ensemencement, montrant que l'amidon, dans cette partie, a été totalement hydrolysé.

A 45°, température pour laquelle nous n'avons pas apporté de photographies, les aspects sont les mêmes, en ce qui concerne *P. deliense*, qu'en ce qui a trait aux autres Champignons à 35°C.

CHAPITRE IV. — LES SPORANGES

Bien que *P. deliense* ait été cultivé sur des milieux très divers, on n'est pas parvenu à obtenir la formation de sporanges. Celle-ci cependant a été obtenue récemment (1934) par MEURS sur solution de Petri (1913). Personnellement nous n'avons jamais réussi à en avoir en grand nombre. La technique utilisée a été la suivante : le Champignon est mis à se développer sur agar-farine d'Avoine, jusqu'à ce qu'il y ait production d'un mycélium aérien suffisamment abondant, ce qui demande environ 3 à 4 jours à 18-22°, et de minimes portions de ce mycélium sont portées sur solution de Petri à 30°, dans de petites boîtes de Petri. Le développement s'opère d'abord presque exclusivement en surface. Après 8 heures, les organes sexuels commencent à se former et ils sont bientôt, après plusieurs jours, au nombre de quelques milliers, tant sur l'ancien que sur le nouveau mycélium, là où celui-ci est exposé à l'air. Après 2 ou 3 jours, le protoplasme s'accumule aux extrémités des hyphes qui, en conséquence, s'élargissent. Finalement, ces parties renflées sont séparées du reste de l'hyphe par une cloison ou, si leur position est intercalaire, par 2 cloisons transversales. Ces corps sont des sporanges filamenteux (pl. I, fig. 1).

Pour obtenir des zoospores, le mycélium a d'abord été débarrassé des gouttes de solution adhérentes, puis placé dans des verres de montre contenant de l'eau de conduite fraîche. On a opéré également avec des cultures en gouttes pendantes. Les observations ont été poursuivies, à l'immersion, à la température de la pièce. Le sporange augmente de diamètre en raison de l'absorption d'eau qui s'accumule dans les vacuoles, qui s'élargissent, et finalement, après quelque temps, 45 minutes environ, les sporanges commencent à émettre un filament à l'intérieur duquel passe leur contenu. Lorsque le tube a atteint sa longueur définitive, qui est d'ailleurs variable,

une vésicule se développe à son extrémité. A ce moment tout le protoplasme émigre à l'intérieur de la vésicule, très rapidement, tandis que le sporange et le filament restent vides (pl. I, fig. 2). La vésicule ne tarde pas à prendre une forme arrondie (pl. I, fig. 3). Comme sa membrane est très mince (pl. I, fig. 3, 4 et 5), il est facile de suivre toutes les modifications qui surviennent à son intérieur et qui sont telles que les a décrites EDSON chez *Pythium aphanidermatum*. Cette vésicule augmente de volume et il apparaît des vacuoles dans la masse cytoplasmique. Il se forme des lignes de clivage et de courts cils peuvent être distingués à la périphérie. La masse tout entière est alors agitée d'un mouvement de rotation et durant ce temps les spores acquièrent peu à peu leur forme définitive. (pl. I, fig. 4). Au bout de quelques minutes, chacune d'elles est, d'ailleurs, nettement individualisée et manifeste un rapide mouvement de natation (pl. I, fig. 5). La membrane de la vésicule se déchire finalement, cédant à la pression interne exercée sur elle par les zoospores réniformes (pl. I, fig. 6) qui s'échappent dans toutes les directions. Pendant la période de clivage interne, la membrane de la vésicule semble fonctionner comme une membrane semi-perméable ; l'organe, en effet, ne cesse de s'accroître. Le temps écoulé entre la formation de la vésicule et la libération des spores est d'environ 20 à 25 minutes.

Il ne nous paraît pas inutile de signaler certains phénomènes en rapport avec la formation des sporanges et des zoospores. Le mycélium prélevé sur Pomme de terre donne, lui aussi, des sporanges. Afin d'obtenir de meilleurs résultats le Champignon doit d'abord être cultivé à 15-25° ; s'il est emprunté à un Champignon se développant à 28°-29° et que des fragments de mycélium aérien sont portés sur solution de Petri à 30°C, il ne se forme pas de sporanges. La formation des organes sexuels est même retardée. Lorsque un Champignon qui se développait à une température basse est cultivé à 30° sur solution de Petri, il semble qu'il reçoive un stimulus qui lui fait, d'abord, produire une grande quantité d'organes sexuels et, ensuite, après environ 3 jours, des sporanges.

Si les masses sont trop petites, on n'obtient pas de bons résultats. A côté de sporanges filamenteux terminaux et intercalaires, souvent porteurs de renflements latéraux, on a rencontré des corps terminaux lobés et ramifiés, de taille et d'aspect variables, puis un

assez grand nombre de corps filamenteux intercalaires, de tailles différentes, pourvus de protubérances (pl. I, fig. 9 à 12). Dans ceux-ci le protoplasme est généralement distant de la membrane en maints endroits (pl. I, fig. 9 et 10). Nous avons tenté d'obtenir leur germination, mais nous n'avons pu avoir de zoospores à partir d'eux. Parmi les corps lobés, beaucoup germèrent, mais jamais nous n'avons rencontré de vésicules ou de zoospores. Cette germination était normale au début, puis elle se ralentit bientôt, pour cesser

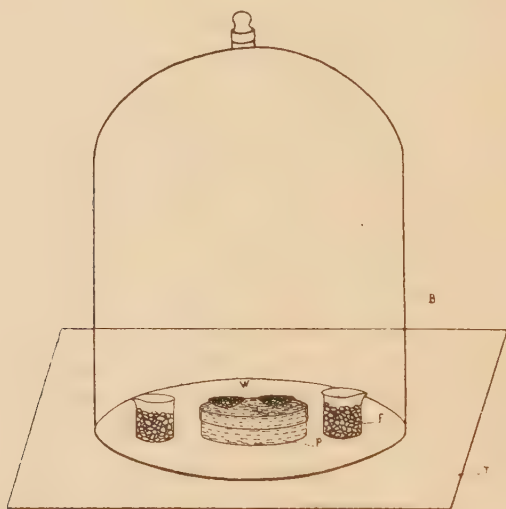


Fig. 7. — B, cloche ; F, récipient avec glace ; P, boîte de Petri avec eau froide ; T, un coin de table ; W, verre de montre avec eau froide et mycélium sporangifère.

ensuite (pl. I, fig. 14). L'aspect d'un grand nombre de ces formations lobées rappelle celui des sporanges de *P. aphanidermatum* et leur germination, du reste, est identique à celle des sporanges de cette même espèce et de *P. deliense*. Nous inclinons à penser que les deux sortes de corps dont nous venons de parler sont de même nature que les sporanges. Ils peuvent donner, dans des conditions favorables, des zoospores. A cet égard le Champignon est particulièrement sensible à la température. C'est ainsi que si le mycélium, après avoir été cultivé à 30°, est porté dans l'eau fraîche, dont la température est d'environ 20 à 25°, ou si, dans la chambre, il règne une

température comparable, nombreux sont les sporanges dont la germination ne s'effectue qu'à demi ou même qui ne germent pas du tout. Lorsque la température de la pièce était aux environs de 25 à 27°, nous avons abaissé celle-ci pour les cultures, artificiellement, en plaçant le matériel dans des verres de montre à l'intérieur d'une cloche suivant le dispositif représenté dans la figure 7.

La température de l'eau avait été abaissée par l'addition d'un fragment de glace, mais il convient de noter qu'une température trop basse serait incompatible avec la germination des sporanges.

Dans un cas seulement, nous avons vu des zoospores se déplaçant sur une boîte de Petri portant le Champignon et remplie d'une solution de Petri et qui avait été placée pendant 5 jours à la température de 30°, puis ramenée à la température de la chambre (18-22°) où elle avait séjourné pendant environ 2 heures.

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE CYTOLOGIQUE DES *PYTHIUM*

CHAPITRE I. — HISTORIQUE

Avant d'exposer les résultats de notre étude cytologique des *Pythium*, nous voudrions donner un bref aperçu de ceux acquis jusqu'ici sur ce genre.

Le premier travail sur les noyaux des *Pythium* est dû à FISCH (1885). Avant lui certains auteurs avaient fait quelques observations vitales. PRINGSHEIM avait admis, en effet, l'existence d'anthérozoïdes, mais ses idées n'avaient pas été acceptées ni par ROZE ni par CORNU, appuyés par DE BARY et par WORONIN. Ce dernier démontra qu'une partie seulement du contenu de l'anthéridie pénètre dans l'oogone. Ces mêmes auteurs reconnurent l'existence indépendante, dans l'oogone, d'une oosphère et d'une petite portion de périplasme. C'est, en effet, DE BARY (1881 et 1887) qui a montré que l'espace, situé entre l'oosphère et la paroi de l'oogone, est rempli par du protoplasme granuleux et d'aspect hyalin, ou périplasme, qu'il est parfois malaisé de distinguer. Il pensait que chez *Pythium*, comme chez *Phytophthora*, le périplasme ne participe pas à la formation de l'oospore, qu'il entoure simplement.

WARD, chez certains *Pythium*, en 1883, a admis l'existence d'un cytoplasma fortement granuleux, qu'il figure et décrit et qu'il voit disparaître en 2 heures environ après la fécondation. D'après lui le contenu de l'anthéridie, sauf une très petite quantité de protoplasma

granuleux, passe dans l'œuf en 4 heures environ. Pour FISCH (1885), il existe, dans le jeune oogone, 10 à 20 noyaux qui fusionnent pour en donner un unique. Dans l'anthéridie, il rencontre toujours un seul noyau, mais il incline à penser que ce noyau est le résultat d'une fusion d'un certain nombre d'autres. Ce noyau émigre dans l'oosphère avec le gonoplasme et disparaît avec le noyau de l'œuf. Il décrit un processus de fusion nucléaire collective dans l'oogone.

DANGEARD (1894) dans ses « Recherches sur la reproduction sexuelle des Champignons » dit : le *Pythium proliferum* possède également de nombreux noyaux soit dans les oogones, soit dans les anthéridies. En 1901, TROW publie un important travail sur la cytologie de *Pythium ultimum* et la même année MIYAKE donne son mémoire sur la « Fécondation chez *Pythium de Baryanum* ». Ces deux derniers auteurs montrent qu'il n'y a pas de fusion nucléaire collective dans l'oogone. Ils s'opère une division nucléaire dans chaque organe sexuel et un seul noyau mâle va féconder un unique noyau femelle. Plus tard, en 1915, EDSON étudiant *Rhaeosporangium aphanidermatum*, maintenant connu comme un *Pythium* : *P. aphanidermatum*, n'a pu trouver de mitose à l'intérieur des organes sexuels. D'après lui les noyaux, chez ce dernier, se formeraient dans les hyphes parents et émigreraient dans les organes sexuels, exactement comme en période non sexuelle. Un noyau mâle féconde un noyau femelle. Sans doute la mitose réductrice s'opère-t-elle lors de la première division du noyau de fécondation, mais il n'a pu en apporter la preuve, qui ne saurait résider que dans une numération des chromosomes.

Enfin, PATTERSON en 1927 a entrepris l'étude du *Pythium torulosum*. Il a rencontré une division nucléaire dans chaque organe sexué et la fécondation d'un noyau femelle par un noyau mâle. D'après TROW, MIYAKE et PATTERSON, les noyaux se disposent plus ou moins en un cercle proche de la périphérie avant que de se diviser. Suivant EDSON, cette disposition se retrouverait aussi dans l'oogone, mais sans qu'il y ait division des noyaux.

Récemment DANGEARD (1931) a rencontré, chez *P. muscae*, un noyau avec un seul nucléole de grande taille, des granulations lipidiques et des chondriosomes sphériques qu'il désigne, à tort, sous le nom de cytosomes.

GUILLIERMOND et OBATON (1934), étudiant l'action du pH du milieu dans la coloration vitale des cellules végétales, ont constaté que lorsque *P. de Baryanum* est cultivé sur une solution peptonée, additionnée de rouge neutre, la coloration commence à pH 6.0 pour devenir intense à pH 7,20 et cesser complètement à pH 8. A la suite de leurs observations sur ce Champignon, comme sur d'autres végétaux, ces auteurs pensent que, vraisemblablement, la coloration vitale n'est réalisable qu'à un pH plus ou moins voisin de la neutralité.

CHAPITRE II. — MYCÉLIUM.

OBSERVATIONS PERSONNELLES

A. — Observations sur matériel vivant.

1^o *Observations générales.* — L'étude *in vivo* des quatre Champignons (*P. deliense*, *P. de Baryanum*, *P. mamillatum* et *P. indigoferae*) est rendue difficile du fait du peu d'épaisseur des filaments. Mais, de tous, c'est *P. indigoferae* qui possède le mycélium le plus grêle. A un fort grossissement et sans coloration, on peut reconnaître les grandes vacuoles avec, parfois, des corpuscules intravacuolaires en mouvement, des globules lipidiques brillants qui se déplacent et, enfin, le cytoplasma d'aspect dense (Pl. II, fig. 1-3 et Pl. III, fig. 13, 14 et 20). Les noyaux ne sont pas visibles.

Lorsque l'on observe des filaments mycéliens d'une culture sur solution peptonée à 1%, à un fort grossissement, on aperçoit d'abord, dans le cytoplasme, un certain nombre de petits globules très réfringents, entraînés rapidement par les courants cytoplasmiques. Leur nombre, comme leur taille, est fort variable d'un filament à un autre et même d'une extrémité à l'autre d'un filament, et en rapport aussi avec l'âge de ce dernier. Aux extrémités des filaments ils sont, d'ordinaire, assez petits et peu nombreux. Dans les filaments âgés ils sont, le plus fréquemment, de grande taille ; souvent accolés par deux, trois, quatre ou davantage (Pl. II, fig. 1 à 3). Lorsque l'on traite le mycélium par l'acide osmique à 1%, les globules brunissent ; ils sont teintés en rouge par le Soudan III et le Scharlach R ; ils sont solubles dans le chloroforme, la benzine, l'éther et l'alcool méthylique. Ils ne sont pas colorés par le rouge neutre ou les autres colorants vitaux du système vacuolaire, ni par ceux du chondriome, tel le vert Janus. On peut donc les considérer comme des granulations lipidiques, produits du métabolisme.

Chez *P. indigoferae*, ils sont en moins grand nombre que chez les autres *Pythium* étudiés ; et nous avons pu constater, au cours de nos recherches, que leur nombre et leur taille augmentent lorsque le mycélium est cultivé sur des milieux riches en glucides, tels la Pomme de terre, l'agar-farine d'Avoine ou l'agar-farine de Maïs, etc. Bref, ces formations ressemblent aux granulations lipidiques rencontrées déjà, chez d'autres Champignons, comme le *Saprolegnia*, par exemple (GUILLIERMOND, 1920).

2° *Le système vacuolaire.* — En raison du peu de différence de réfringence existant entre le suc vacuolaire et le cytoplasma, l'étude du système vacuolaire sur le vivant, sans aucune coloration, demande quelque habitude. De toute façon on ne peut apercevoir sans coloration les très petites vacuoles situées aux extrémités des filaments. Souvent on les voit rangées en chaînette, à la suite les unes des autres (pl. II, fig. 1, 2 et pl. III, fig. 13), petites et grandes mélangées. Toutes sont entraînées, avec les globules lipidiques, par les mouvements cytoplasmiques.

Coloration vitale. — Afin de mieux distinguer le système vacuolaire nous avons utilisé un colorant presque spécifique des vacuoles : le rouge neutre et accessoirement nous nous sommes également servi des bleus de crésyl, de toluidine et de méthylène.

Aux extrémités des filaments ainsi traités par le rouge neutre on aperçoit, parfois, de petites vacuoles (pl. II, fig. 3 et 13, pl. III, fig. 20) qui fusionnent et en forment de grandes ; mais, le plus souvent, le système vacuolaire apparaît sous la forme de larges canalicules qui s'anastomosent et donnent un réseau avec des renflements aux points de jonction (pl. II, fig. 4). Dans les parties âgées du filament, les canalicules, lors de leur fusion, réalisent un grand canal vacuolaire, qui occupe la plus grande partie du filament. Le cytoplasme est alors réduit à une couche pariétale (pl. II, fig. 5 et 12 ; pl. III, fig. 14 et 21) qui s'amincit de plus en plus, à mesure que le canal vacuolaire augmente. A l'intérieur de ce système, se trouve une substance, à l'état de solution très concentrée, qui adsorbe le colorant. Mais à mesure que les vacuoles grossissent, cette substance, devenant de plus en plus étendue, se colore d'une manière de plus en plus pâle. Lorsque le canal vacuolaire est définitivement constitué, le suc vacuolaire ne se colore plus que d'une manière très

faible. Le système vacuolaire offre donc, chez ces Champignons, les mêmes formes que celles observées par GUILLIERMOND dans le *Saprolegnia* et le *Rhizopus nigricans*. Il est facile de constater que les formes canaliculaires initiales du système vacuolaire sont tout à fait différentes et indépendantes du chondriome. Ceci apparaît surtout nettement quand on plonge les filaments, préalablement colorés par le rouge neutre, dans une solution diluée de vert Janus. Les chondriosomes se teintent alors à leur tour et l'on a, côte à côte, différemment colorés, chondriome et système vacuolaire (pl. II, fig. 13 et 14).

Lorsque l'on traite les filaments par une solution très diluée de rouge neutre, les vacuoles prennent une teinte rouge pâle après quelques secondes. Au bout de plusieurs minutes, on voit à leur intérieur un assez grand nombre de petits corpuscules plus intensément colorés que le suc dans lequel ils baignent, et qui sont agités de mouvements browniens. Ces corpuscules s'entrechoquent, s'accrochent et finissent par fusionner, donnant ainsi des corps de plus en plus gros, jusqu'à ce qu'il n'y en ait plus généralement qu'un seul par vacuole. A mesure que ce processus se poursuit, leur aspect se modifie; on en rencontre d'immobiles, situés sur le bord de la vacuole (pl. II, fig. 7 et pl. III, fig. 20), ayant parfois l'aspect de croissants (Pl. II, fig. 7). Après quelque temps, la coloration du suc vacuolaire s'estompe progressivement, celle des corpuscules perd aussi de son intensité et, finalement, il n'est plus possible de distinguer aucune coloration à l'intérieur du filament.

Au sujet de cette décoloration, on ne peut admettre que le rouge neutre soit réduit, car on sait que son potentiel d'oxydo-réduction est plus bas que celui du cytoplasma et que, par conséquent, il ne peut être transformé en leucodérivé dans les cellules vivantes. Il est difficile de supposer que le colorant puisse être rejeté, étant donné qu'il est énergiquement adsorbé par les colloïdes vacuolaires. La seule explication serait donc d'admettre que le colorant est détruit et assimilé par la cellule vivante. Cette hypothèse a déjà été exprimée par GUILLIERMOND (1930 a), GAVAUDAN (1933) et GAUTHERET (1935).

Si l'on traite le Champignon par une solution de rouge neutre plus concentrée que la précédente, les précipités décrits ci-dessus apparaissent immédiatement et ils sont alors fortement colorés, tan-

dis que le suc vacuolaire demeure incolore. Ils manifestent les mêmes mouvements et fusionnent de la même manière pour donner, en fin de compte, un corps volumineux qui s'accole à la paroi de la vacuole (pl. II, fig. 8). On constate, parfois, que dès que les corpuscules entrent en contact avec les bords de la vacuole, le colorant diffuse et les bords de la vacuole se teintent plus ou moins intensément (pl. II, fig. 9), puis le colorant diffuse à nouveau à l'intérieur de la vacuole (pl. II, fig. 10), qui se colore ensuite entièrement d'une façon homogène, peu intensément, pour finir par se décolorer totalement. Il arrive, mais très rarement, que, entraînées contre la paroi de la vacuole, ces granulations franchissent celle-ci et viennent se déposer dans le cytoplasma périvacuolaire (pl. II, fig. 11) (GUILLIERMOND, MANGENOT et PLANTEFOL, 1933, p. 290-291).

Des résultats assez analogues ont été obtenus par GUILLIERMOND (1934 a) dans son étude de la coloration vitale du *Saccharomycodes Ludwigii*, *Saccharomyces ellipsoideus*, *Penicillium glaucum* *Zygosaccharomyces Chevalieri*, etc.

Ce même type de coloration, qui a été constaté dans les cellules animales, a été étudié et expliqué par von MÖLLENDORF (GUILLIERMOND, MANGENOT et PLANTEFOL, 1933). L'explication de ce savant peut fort bien être appliquée au cas présent et l'on peut ainsi penser que, la vacuole étant ordinairement acide et le rouge neutre un colorant basique, lorsque celui-ci pénètre dans la cellule il détermine la précipitation des colloïdes vacuolaires. Si le colorant est en excès par rapport à ceux-ci, il leur communique sa charge et provoque la dissolution des précipités, ainsi que la coloration globale de la vacuole.

Une solution concentrée de rouge neutre est toxique pour les Champignons, qui meurent assez vite, les filaments prenant alors une coloration rouge foncée et montrent leur vacuole décolorée, ce qui permet de distinguer aisément ceux qui sont encore vivants, leurs vacuoles étant seules colorées.

Avec les bleus de toluidine, de crésyle et de méthylène, le contenu vacuolaire prend une coloration rouge violacée, comme l'a décrit GUILLIERMOND antérieurement.

Cultures en milieux additionnés de rouge neutre et coloration des vacuoles pendant la croissance du Champignon. — Si l'on cultive les Champignons sur milieu peptoné à 1 %, auquel on ajoute

1 mgr. % de rouge neutre, on constate qu'il n'y a pas de coloration des vacuoles. On peut alors augmenter le pourcentage du colorant et l'on voit qu'à la dose de 4-5 mgr. % on réussit à obtenir une bonne coloration des vacuoles pendant la croissance des Champignons, bien qu'un certain nombre de filaments meurent. Ce nombre augmente naturellement avec le pourcentage de colorant additionné. Cependant, pour *P. indigoferae*, 5 mgr.% de rouge neutre n'ont pas suffi pour obtenir une coloration des vacuoles et les meilleurs résultats, dans ce cas, furent obtenus avec 7 mgr.% de colorant.

On retrouve, dans les filaments colorés pendant leur croissance, les canicules, le réseau et, d'une façon générale, tous les aspects du système vacuolaire décrits plus haut et ceci très nettement. Les corpuscules apparaissent sous des formes variées (pl. II, fig. 12 et pl. III, fig. 14). Dans les parties plus âgées, le suc vacuolaire est coloré (pl. II, fig. 16), cependant que les corpuscules sont toujours très nets, bien qu'un certain nombre d'entre eux soient moins teints. De place en place, on rencontre des corpuscules aux mouvements lents et ayant la forme de plaquettes de taille et d'aspect variables (pl. II, fig. 15 et pl. III, fig. 14 et 21). En se fusionnant ils donnent des corps particuliers, les uns ressemblant à des X, les autres à des croissants, etc. Certains paraissent même être creusés en leur centre (pl. III, fig. 14).

On obtient des résultats analogues si l'on ajoute le rouge neutre à des milieux solides comme l'agar-farine de Maïs ou le Soja-agar. Il faut, cette fois encore, atteindre le pourcentage de 7 mgr. pour obtenir de bons résultats avec *P. indigoferae*. Les organes sexuels sont également apparus sur milieux solides (farine de Maïs additionnée de rouge neutre) et leur système vacuolaire s'est coloré pendant le développement.

Mentionnons ici que le sporange de *P. deliense* possède plusieurs vacuoles (pl. I, fig. 7 et 8).

3° *Le chondriome*. — Nous avons déjà indiqué que l'étude *in vivo* du chondriome demandait quelque habitude. Lorsqu'on les traite par une solution de vert Janus, les préparations prennent une légère teinte rose après quelques minutes, car ces Champignons ont le pouvoir de réduire le colorant. Ce fait a été observé pour la

première fois par moi sur l'une de ces espèces de *Pythium* en 1932 ; mais les chondriosomes finissent par se colorer. On peut utiliser, en dehors du vert Janus, le violet de dahlia, que l'on prépare comme les solutions de rouge neutre.

Sans coloration vitale, il est facile de distinguer les chondriosomes des globules lipidiques ; ces derniers sont beaucoup plus réfrigents que les premiers et sont beaucoup plus rapidement entraînés que ceux-là dans les courants cytoplasmiques. En outre, les chondriosomes se colorent par le vert Janus ; ils apparaissent sous forme de mitochondries granuleuses mélangées de chondriocontes (pl. II, fig. 2, 13 et 14), mais, chez *P. de Baryanum*, on rencontre des chondriosomes ayant l'aspect de fuseaux.

La coloration des chondriosomes par le vert Janus s'opère après environ 10 à 15 minutes, alors que celle des vacuoles par le rouge neutre est presque instantanée. Parfois les éléments du chondriome se gonflent et se vésiculisent (pl. II, fig. 17). Nous avons indiqué plus haut le résultat de la double coloration simultanée pour le rouge neutre et le vert Janus (voir page 61). Avec le violet de dahlia, on peut, fort rarement, arriver à mettre en évidence les noyaux (*Ibid.*) ; mais, d'une façon générale, ceux-ci ne sont pas visibles sur le vivant.

Réduction du vert Janus. — Pour étudier le pouvoir réducteur des quatre espèces de *Pythium* vis à vis du vert Janus nous les avons cultivé, à 20°C, sur peptone à 1 %, durant quatre jours ; on les lave doucement ensuite, pendant quelques secondes, afin de les débarrasser des gouttelettes de la solution de peptone, puis on les plonge dans une solution de vert Janus durant 15 minutes, après quoi on monte dans une solution de Ringer. Au bout de 10 minutes environ, la coloration rouge saumon apparaît, surtout marquée chez *P. deliense* et *P. indigoferae*, moins intense et moins rapide chez les deux autres espèces.

B. — Observations sur matériel fixé.

1° *Le système vacuolaire.* — Il est aisé d'obtenir l'image négative du système vacuolaire après traitement des Champignons par les liquides de Flemming, de Regaud, de Tupa-Regaud et de Helly ; dans ces deux derniers cas même sans postchromisation.

Les meilleurs résultats nous ont, d'ailleurs, été fournis par le liquide de Helly. Le système vacuolaire apparaît alors, dans les extrémités des filaments, sous forme de petites vacuoles ou de canalicules et, parfois, de grosses vacuoles, toujours incolores (pl. III, fig. 3, 8, 12 et 17).

Nature des précipités vacuolaires. — Aux corpuscules qui apparaissent sous l'action des colorants vitaux, on a donné le nom de : précipités intravacuolaires, du fait de leur présence à l'intérieur d'une vacuole. GUILLIERMOND (1903, 1920 a) a montré qu'ils sont, ordinairement, constitués par de la métachromatine ou volutine, chez les Champignons. On peut, pour les étudier ici, de ce point de vue, fixer le mycélium par le formol ou l'alcool absolu, pendant 1-2 heures, colorer ensuite par une solution aqueuse à 1% de bleu de méthylène, de bleu de crésyle ou de bleu de toluidine, durant 1 minute ; laver à l'eau et enfin monter dans la glycérine. On ne rencontre pas alors de corpuscules colorés en rouge dans la vacuole, ce qui indique que dans les Champignons du genre *Pythium*, ils ne sont pas formés de métachromatine. De plus, lorsqu'on traite une préparation, fixée à l'alcool absolu (ou au formol) et colorée par le bleu de méthylène, par une solution aqueuse d'acide sulfurique à 1% (réaction I de Arthur MEYER), on constate que tous les précipités se décolorent. On sait que les corpuscules métachromatiques demeurent colorés en rouge dans les mêmes conditions, tandis que tout le reste du protoplasme se décolore. Aussi peut-on conclure que ces Champignons ne paraissent pas posséder de métachromatine. Les mêmes résultats ont, d'ailleurs, été obtenus par GUILLIERMOND chez *Saprolegnia* (*La Cellule*, 1920 b). En dépit de la différence de leur contenu, on peut fort bien comparer, quant à la forme des précipités intravacuolaires, la figure 11' de notre planche II, par exemple, avec celle de *Penicillium glaucum* (GUILLIERMOND, *Le vacuome*, 1934, fig. 4 A²) et nos figures 7, 8 et 9 (pl. II) avec la figure 3, *Saccharomyces Ludwigi*, du même auteur (*loc. cit.*).

2° *Le chondriome.* — Toutes les techniques habituellement utilisées pour la mise en évidence du chondriome nous ont réussi. Le plus souvent il n'est pas nécessaire d'avoir recours à des inclusions dans la paraffine. Il est même préférable de fixer et de colorer en

masse le mycélium, car on a ainsi une meilleure vue d'ensemble de son contenu. Le seul avantage des coupes à la paraffine c'est qu'elles permettent une différenciation meilleure. D'une façon générale les résultats les plus nets ont été obtenus après fixation par le liquide de Helly ou le sublimé-formol. La méthode de Regaud s'est montrée peu favorable, ce qui s'accorde avec ce que l'on a déjà constaté pour les Saprolegniacées (GUILLIERMOND). La coloration a été faite à l'hématoxyline ou au violet de gentiane en solution aqueuse. Ces colorants ne se fixent pas sur le système vacuolaire, mais permettent de voir, en même temps que le chondriome, les noyaux. Au sujet de ces derniers, on peut noter que, fort souvent, le liquide de Helly nous a donné des résultats supérieurs même à ceux obtenus avec le mélange de Flemming.

Nous savons, d'après les observations vitales rappelées plus haut, que le chondriome est représenté ici par des chondriocontes et des mitochondries granuleuses (pl. III, fig. 1-8, 11, 12, 16-19). Les chondriocontes varient légèrement de forme, de nombre et de longueur, sans jamais atteindre toutefois une dimension importante. Tantôt, on en rencontre en quantité en un endroit, cependant que plus loin il y en a fort peu et, en un autre point, pas du tout. Chez *P. indigoferae*, il semble que les mitochondries sont moins abondantes et que les chondriocontes sont un peu plus allongés et plus minces que chez les autres *Pythium* étudiés ; chez *P. de Baryanum*, les chondriosomes ont parfois l'aspect de fuseaux (pl. III, fig. 11), aspect que l'on ne retrouve généralement pas chez les autres espèces, sauf chez les Saprolegniacées.

Nous avons naturellement rencontré des formes d'altération du chondriome. Il s'agit en l'espèce de la cavulation des chondriosomes (pl. III, fig. 1, 2, 16 et 19), c'est-à-dire de leur gonflement et transformation en grosses vésicules. L'intensité du phénomène est très variable.

Nous avons constaté la fragmentation des chondriocontes qui, pour ce faire, s'allongent et prennent la forme d'haltères dont les 2 parties finissent par se séparer (pl. III, fig. 2, 5 et 11). A la fin de ce processus, chaque nouveau bâtonnet porte un léger renflement à l'une de ses extrémités (pl. III, fig. 1, 2 et 8).

Nous devons attirer l'attention, à propos des *Pythium*, sur un fait assez particulier déjà observé par GUILLIERMOND dans les Sa-

prolégniacées, relatif à la fixation du chondriome et qui montre combien la constitution chimique des chondriosomes est susceptible de varier dans une certaine mesure d'une espèce à l'autre. Dans les *Pythium*, en effet, les liquides fixateurs (Bouin, Flemming fort et Lenhossek), renfermant de l'alcool, de l'acide acétique et du formol conservent le chondriome qui on le sait est habituellement détruit par ces mêmes substances (sauf chez *Saprolegnia*, GUILLIERMOND 1920 b). La plupart des mélanges employés pour fixer les noyaux conservent donc le chondriome.

C'est ainsi que le sublimé formol contenant 3% d'acide acétique ou un mélange d'acide picrique, d'alcool, d'acide acétique et de sublimé (1) conservent également le chondriome.

Il me semble que, pour ces Champignons, un fixateur renfermant du sublimé est le plus indiqué pour la conservation du chondriome.

Le chondriome est de même conservé par un mélange d'acide osmique à 1% et d'iodure de potassium, mais l'acide osmique n'est pas réduit. Avec le liquide de Lugol, il prend une teinte jaune, plus marquée que pour le cytoplasme. Mais ces procédés ne remplacent pas les colorations usuelles, à l'hématoxyline, par exemple.

Nous avons, de plus, cherché à reconnaître l'action de la température sur le chondriome. Le mycélium de *P. deliense* a été cultivé à la température de 45-50° sur une solution à 1 % de peptone. Il a été coloré ensuite vitalement par le vert Janus, fixé par le sublimé formol, puis coloré à l'hématoxyline. La réfringence des éléments du chondriome est alors moindre, comme aussi leur élection pour le colorant vital. Dans les préparations fixées et colorées on en rencontre quelques-uns qui sont demeurés normaux, mais beaucoup de ces éléments ont subi des altérations, ils sont cavulés (pl. III, fig. 7). Chez d'autres l'altération est seulement partielle. Ainsi donc les éléments du chondriome sont cavulés, mais ne sont pas détruits par une élévation de la température et nos recherches confirment à ce point de vue les résultats de FAMIN (1933) et s'opposent à ceux de POLICARD et MANGENOT (1922).

(1) Bichlorure de mercure 4 gr. et acide acétique 5 cc. dans 100 cc. d'une solution saturée d'acide picrique dans l'alcool à 70. Fixation de 8 à 24 heures.

Nous noterons que le chondriome des sporanges de *P. deliense* offre le même aspect que celui du mycélium (pl. I, fig. 8).

3° *Examens microchimiques.* — Les réactions que nous avons faites sur le mycélium en vue de décélérer la cellulose, la callose, le glycogène (substance de réserve que l'on rencontre dans les organes sexuels) ou les cristaux protéiques n'ont donné aucun résultat. Par contre celles des lipides se sont montrées positives au niveau des globules réfringents décrits ci-dessus (granulations lipidiques).

La membrane semble constituée par de la chitine à en juger par la réaction obtenue en faisant agir une solution d'iode dans l'acide sulfurique et qui nous a donné une coloration jaune. Aucune réaction positive n'a toutefois été obtenue avec le rouge de ruthénium, le bleu coton ou le réactif de Millon.

4° *Les noyaux.* — Le noyau au repos.

Nous avons coloré en masse les noyaux des *Pythium* et pour *P. deliense* nous avons, de plus, fait des coupes à la paraffine. Les méthodes que nous avons employées sont très diverses. Nous avons eu de bons résultats avec les liquides de Bouin, de Meves et de Helly. Les meilleurs ont été obtenus avec le mélange faible de Flemming. Nous avons essayé une vingtaine de formules différentes avant de trouver la concentration optimale, qui paraît varier avec chaque objet. Quant aux colorations, celle recommandée par SMITH (1923) ou celle de Gram modifiée par COUCH (1932) ne nous ont pas donné de bons résultats. C'est encore l'hématoxyline de Heidenhain, suivie de la coloration à l'érythrosine en solution aqueuse à 1%, qui s'est montrée la plus favorable.

Les noyaux se rencontrent partout dans le mycélium, ils sont répartis sans aucun ordre. Leur taille est réduite, mais elle paraît l'être surtout vers les extrémités des filaments. En dehors de leur taille, les noyaux des 4 espèces de *Pythium* se ressemblent absolument. *P. mamillatum* possède les plus grands et *P. indigoferae* les plus petits. Leur forme est généralement sphérique et parfois ovoïde (pl. III, fig. 1-6, 8, 12, 16, 18 et 19). Entraînés et comprimés par les courants cytoplasmiques, ils peuvent apparaître fusiformes comme dans les Saprolegniacées (pl. III, fig. 11, 16 et 18) et allongés dans le sens du courant. Ils sont entourés par une fine membrane

(pl. III, fig. 9) et l'on aperçoit, en leur centre, un nucléole qui occupe presque la moitié du volume nucléaire et qui, outre sa taille relativement considérable, se distingue par son affinité pour les colorants. Ce nucléole baigne dans le nucléoplasme dans lequel on aperçoit, de plus, un fin réseau qui le relie à la périphérie. On distingue également, sur de bonnes préparations, de petits granules de chromatine tant sur les mailles du réticulum que contre la membrane nucléaire, plus visibles ici que là.



CAPITRE III. — ORGANES SEXUELS

A. — Observations sur matériel vivant.

Nous avons examiné le *P. deliense* de divers points de vue. La reproduction sexuelle a pu être étudiée avec quelque détail en faisant pousser le Champignon sur de petites boîtes de Petri renfermant des couches très minces d'agar-farine de Maïs ou d'agar pur. Pour l'examen au microscope les boîtes ont été retournées, mais cette façon de faire ne permet pas un bon examen. Aussi avons-nous préféré pratiquer de la façon suivante. On place dans de grandes cellules de van Tieghem, en goutte pendante, une mince couche de farine de Maïs stérilisée ou d'agar pur, que l'on ensemece. L'examen peut alors être poursuivi à de forts grossissements. Lorsque la température de la pièce est à environ 29-31°C on peut aussi prélever une petite touffe de mycélium aérien dans les boîtes de Petri que l'on porte en goutte pendante dans de la solution de Petri, sur cellule de Van Tieghem. Dans ce cas, les organes sexuels se forment très rapidement. Enfin on peut examiner directement ce mycélium, après avoir ajouté 4% mgr. de rouge neutre à la culture.

D'ordinaire les hyphes porteurs d'anthéridies sont dressés et ceux porteurs d'oogones — qui prennent naissance sur les premiers — sont fortement inclinés vers ceux-ci (pl. IV, fig. 2). Même lorsque les hyphes à anthéridies et à oogones sont parallèles (pl. IV, fig. 1) les seconds s'incurvent vers les premiers.

Formation des organes sexuels.

Anthéridies. — L'extrémité de l'hyphe cesse de s'allonger et commence à grossir légèrement. Sa taille s'accroît peu à peu par apport de protoplasma dense, renfermant de nombreux globules

graisseux, et, finalement, cette extrémité se sépare du reste du filament par une cloison transversale. Grâce à ces modifications, l'anthéridie a acquis sa forme définitive et présente une petite protubérance latérale (pl. IV, fig. 1 et 3). Si les anthéridies sont intercalaires l'hyphe ne se renfle pas; le protoplasma devient simplement plus dense en certains points de l'hyphe et certaines portions du cytoplasma se trouvent délimitées par formation de deux cloisons transversales, une de chaque côté. Cette fois encore, cependant, l'anthéridie n'acquiert sa forme normale que lorsque apparaît la petite protubérance latérale (pl. IV, fig. 2).

Oogones. — Le début de la formation de ces organes est apparemment le même que celui des anthéridies, mais très tôt la partie terminale renflée s'élargit davantage et il y a un apport beaucoup plus considérable, que dans le cas précédent, de cytoplasma riche en globules gras de petite taille. L'oogone acquiert rapidement sa taille normale et se trouve séparé du reste de l'hyphe par une cloison transversale. On le voit placé contre l'anthéridie dès le début de sa différenciation.

Dans les deux sortes d'organes sexuels, à ce moment, on peut constater, en faisant agir le rouge neutre, qu'il n'existe pas de vacuole de grande dimension. Les vacuoles que l'on aperçoit sont petites (pl. IV, fig. 4) et en beaucoup plus grand nombre dans l'oogone que dans l'anthéridie. On distingue, de plus, à l'intérieur des vacuoles, des précipités analogues à ceux rencontrés dans les vacuoles du mycélium. Le vert Janus ne donne pas de résultats bien nets, en raison de la trop grande abondance de globules gras dans le cytoplasma. Néanmoins, on peut reconnaître la présence de mitochondries granuleuses et de quelques bâtonnets (pl. IV, fig. 12). Un traitement par l'acide osmique à 1%, le Soudan III ou la benzine montre nettement que les particules nutritives sont bien les globules gras.

Chondriome et système vacuolaire aux stades avancés. — On distingue aisément les courants cytoplasmiques à l'intérieur de l'oogone. Dans cet organe, on voit les petites vacuoles apparaître et disparaître, puis fusionner entre elles et en constituer de plus grosses. Après quelque temps, une grande partie du protoplasma prend un aspect irrégulier par suite de l'accumulation des globules gras et se condense en une masse centrale. Tout autour on voit une étroite

zone hyaline où le cytoplasma n'est jamais dense et ne renferme que quelques globules graisseux (pl. IV, fig. 3 et 7). Il semble qu'il s'agisse là de la différenciation en partie centrale ou ooplasme et en partie périphérique ou périplasmé. Une coloration vitale au rouge neutre conduit aux mêmes résultats et l'on constate alors que, dans la partie hyaline périphérique, il n'y a que quelques très petites vacuoles, tandis que dans la partie centrale on voit de nombreuses grosses vacuoles (pl. IV, fig. 5), en même temps que de petits amas de globules graisseux. Pendant que ces transformations s'opèrent à l'intérieur de l'oogone un tube émerge de la partie renflée de l'anthéridie, et pénètre à l'intérieur de l'oogone. Après quelque temps, la plus grande partie du contenu de l'anthéridie passe rapidement à l'intérieur de ce canal, une faible portion demeurant dans l'anthéridie. Une coloration au rouge neutre fait alors apparaître dans celle-ci quelques petites vacuoles et une coloration par le Soudan III, ou l'acide osmique, quelques globules graisseux (pl. VI, fig. 1). Mais il n'y a pas de différenciation en gonoplasme et en périplasma, à ce stade.

Ensuite, on voit diminuer le nombre des globules graisseux dans la partie centrale de l'oogone, tandis que les vacuoles fusionnent pour en constituer de plus grosses (pl. VI, fig. 8), jusqu'à ce qu'il n'y en ait plus qu'une seule. A ce moment, si l'on traite l'oogone par le liquide de Lugol, on constate l'apparition du glycogène; celui-ci est diffus dans tout le cytoplasma qui prend, dans son ensemble, une coloration acajou. Il semblerait que le glycogène se forme aux dépens des lipides. Si l'on traite l'oogone par l'acide osmique le cytoplasma apparaît d'abord brun foncé, donnant une réaction analogue à celle des granulations lipidiques et le Soudan III le colore parfois, à ce stade, en rouge. Plus tard, il y a condensation du glycogène et celui-ci apparaît sous forme de globules (pl. VI, fig. 2). Entre temps, une membrane s'est formée qui entoure la partie centrale, elle s'épaissit progressivement et prend un aspect blanchâtre dans l'oogone parvenu à maturité. Nous avons traité alors cette membrane par une solution de chloro-iodure de zinc, par l'acide sulfurique et aussi l'acide iodhydrique fumant et l'hydrate de chloral concentré, mais sans obtenir les réactions de la cellulose. Il en va de même avec le bleu coton et le rouge de ruthénium.

Finalement, on ne distingue plus de vacuoles dans l'oospore

mûre, le rouge neutre ne donne pas de coloration. Par contre on distingue un globule de réserve et un corps réfringent placé entre celui-ci et la membrane (pl. VI, fig. 3). Nous avons tenté de déterminer la nature chimique de ce globule de réserve, mais nos conclusions demandent vérification. Traité par le réactif de Millon, l'acide azotique et l'ammoniaque, il n'a pas fourni les réactions des protides et est demeuré incolore. Il est insoluble dans la benzine, l'éther ou le chloroforme; ne se colore pas par le Soudan III, ni par l'acide osmique, ce qui exclut, par conséquent, l'idée qu'il s'agit d'un corps gras. A l'intérieur du globule, on distingue parfois une grande ou plusieurs petites cavités (pl. VI, fig. 4 et 5.)

Bref, nous n'avons pu préciser la nature de la membrane de l'oospore, ni du corps de réserve, que l'on peut rapprocher, quant à sa morphologie de celui décrit par Trow (1901) chez *P. ultimum*. Probablement la membrane de l'oospore est-elle constituée par de la chitine.

B. — Observations sur matériel fixé.

Tous les fixateurs utilisés lors de la fixation du mycélium ont été employés ici, mais les résultats les meilleurs ont été obtenus avec le liquide de Flemming fort, agissant pendant 6 et 12 heures. La coloration a été faite par l'hématoxyline, car ni la triple coloration de Flemming, ni la méthode de Gram utilisée par Couch (1932) ne nous ont paru convenir. Nous avons ajouté un peu de safranine avant l'inclusion, afin de faciliter celle-ci et cette coloration légère a disparu facilement lors du montage des coupes. Nous avons employé trois milieux de culture pour nos Champignons : l'agar-farine d'Avoine, l'agar-farine de Maïs et la solution de Petri. Dans ce dernier cas ce sont des mycéliums aériens prélevés sur agar-farine d'Avoine qui ont été transportés dans la solution. Un certain nombre de boîtes de Petri furentensemencées en même temps et, lorsque apparaissent des organes sexuels, de petits fragments du milieu recouvert de mycélium étaient prélevés au moyen d'un scalpel et directement placés dans le fixateur. Nous avons opéré nos fixations deux fois par jour, ce qui nous a permis de fixer des stades de développement différents, chaque fois le matériel étant emprunté

à une nouvelle culture. On notera ici que les mélanges d'alcool et de xylol doivent être très progressifs, car on provoque une forte plasmolyse quand on passe, sans transition, le matériel de l'alcool absolu dans le xylol pur.

Formation des organes sexuels. — Les observations que nous avons pu faire sur matériel non fixé se trouvent confirmées. On voit le protoplasma renfermant de 4 à 6 noyaux passer dans le filament destiné à donner l'anthéridie (pl. V, fig. 1) et celle-ci acquérir progressivement son aspect caractéristique, puis se séparer du reste de l'hyphe par une membrane transversale (pl. V, fig. 2). De même, on voit s'accumuler le protoplasma porteur de 12 à 20 noyaux environ dans les parties terminales de l'hyphe destiné à évoluer en oogone (pl. V, fig. 1). Quand sa taille définitive a été atteinte, l'oogone se sépare par une cloison transversale de l'hyphe porteur (pl. V, fig. 2). Quelques noyaux à la base des très jeunes oogones et des jeunes anthéridies prennent une forme allongée suivant la direction des courants cytoplasmiques (pl. V, fig. 1). Dans les deux sortes d'organes, les noyaux apparaissent tout d'abord comme de petits corps, mais ils ne tardent pas à augmenter de volume et plus spécialement dans les oogones (pl. V, fig. 2). Le cytoplasma est réparti uniformément, tandis que les noyaux sont distribués sans ordre; on voit quelques petits vacuoles (pl. V, fig. 3). Dans les oogones, les noyaux semblent plus riches en chromatine et être un peu plus grands que dans le mycélium. Jamais on ne rencontre, à ce stade, de noyaux en dégénérescence. Rapidement, au contraire, ils se divisent, quel que soit leur emplacement.

Division nucléaire. — D'après les images qu'il nous a été donné de rencontrer, tant dans le mycélium que dans les organes sexuels, nous pouvons ainsi décrire la mitose chez *P. deliense*.

L'indice de l'entrée en division se marque par une augmentation de la taille du noyau. Les granules chromatiques se transforment ensuite en chromosomes de forme ovale ou en petits bâtonnets (pl. III, fig. 10 et pl. V, fig. 13), tandis que le nucléole est rejeté sur le côté. Il se forme ensuite un fuseau d'apparence fibrillaire, sur lequel les chromosomes viennent se ranger en plaque équatoriale; la membrane nucléaire se dissout et disparaît. Aucun corps chromatique n'est situé aux extrémités polaires du fuseau et nous ne pensons pas qu'il existe de centrosome. Nous avons rencontré un très grand

nombre de bonnes figures métaphasiques dans l'oogone de *P. deliense*. Là non plus la membrane nucléaire n'est plus visible à ce stade. Il nous a été impossible de fixer avec sûreté le nombre de chromosomes qui paraît être tantôt de 4, tantôt de 8.

A la métaphase, le nucléole a complètement disparu. A la télophase (pl. III, fig. 10) la membrane nucléaire réapparaît ; mais les images sont généralement peu nettes.

D'une façon générale, les noyaux des *Pythium* ressemblent à ceux de *Saprolegnia* et tels qu'ils ont été décrits par DAVIS (1903) et par DANGEARD (1931) chez le *P. muscae*. La division rappelle celle des mêmes éléments chez *P. de Baryanum* et *P. ultimum* (MIYAKE 1901 et TROW 1901), chez *Cystopus* et chez *Peronospora* (WAGER 1896, 1900, STEVENS 1899, DAVIS 1900), chez *Saprolegnia* (DAVIS 1903) et chez *Achlya de Baryanum* (TROW 1904). La persistance de la membrane nucléaire durant les premiers stades au moins de la mitose a été vue par MIYAKE (1901), puis par WAGER, STEVENS et DAVIS chez *Cystopus*. D'autre part, DAVIS (1903) et COUCH (1932) ont indiqué l'existence d'un fuseau intranucléaire chez *Saprolegnia* et chez *Leptolegnia caudata*. Chez aucune espèce de *Pythium*, sauf *P. torulosum*, il n'a été signalé de centrosomes et si MIYAKE indique la présence, parfois, de granules aux pôles du fuseau, il ne leur donne pas, toutefois, le nom de centrosomes. WAGER et DAVIS n'en rencontrèrent pas non plus chez *Saprolegnia*, mais d'autres auteurs, tel TROW, en ont vu chez *Achlya de Baryanum*, MURPHY (1918) chez *Pythophthora erythroseptica* et, plus récemment encore, COUCH (1932) chez *Leptolegnia caudata*.

De place en place, dans le mycélium, on rencontre des noyaux qui paraissent se diviser par amitose et ceci surtout après fixation au liquide de Bouin, mais cette question nous paraît devoir être réservée.

Stades finaux. — Après la division des noyaux, ou même aux dernières phases de ce processus, on voit apparaître dans le cytoplasma de grandes vacuoles, qui repoussent les noyaux dans la zone périphérique (pl. V, fig. 5). Le cytoplasma de la région centrale (ooplasme) devient plus dense et se colore plus intensément ; il est entouré par une bande de cytoplasma, moins dense : le périplasme (pl. V, fig. 6 et 7). L'ooplasme poursuit sa différenciation et il se forme une zone en étoile au centre, plus dense, qu'entoure une cou-

che plus vacuolisée (pl. V, fig. 7, 8 et 11). Cette partie centrale, à laquelle on pourrait donner le nom de centralplasme, se colore plus fortement mais n'apparaît, toutefois, jamais en noir sur les préparations. Un des noyaux de la zone périphérique, plus grand que les autres, commence à se diriger vers le centralplasme de l'ooplasme et s'étire (pl. V, fig. 6 et 7). C'est le noyau ♀. Son déplacement peut être dû aux mouvements des vacuoles que l'on distingue fort nettement *in vivo*. Finalement, le noyau ♀ prend la place qu'il doit occuper dans le centralplasme (pl. V, fig. 8) et qui n'est pas toujours au centre. L'ooplasme ainsi pourvu du noyau ♀ constitue l'oosphère. Parfois, dans des préparations défectueuses, une partie du centralplasme apparaît comme une tache noire et on ne peut guère y distinguer le noyau femelle (pl. V, fig. 9). Pendant la migration de ce noyau, ceux situés à la périphérie s'estompent de plus en plus et finissent par disparaître.

Tandis que les noyaux de l'oogone sont en métaphase, ceux de l'anthéridie commencent à entrer en mitose et quelques-uns sont même parfois en prophase (pl. V, fig. 4). Mais les images sont moins facilement lisibles. Un seul noyau persiste dans l'anthéridie ; celle-ci émet un prolongement tubulaire qui s'allonge à l'intérieur de l'ooplasme. Il contient un unique noyau (pl. VI, fig. 6) qu'il envoie finalement dans l'ooplasme (pl. VI, fig. 7). Ce noyau mâle est généralement moins grand que le noyau femelle. Après la fécondation une membrane commence à se dessiner tout autour de l'ooplasme (pl. V, fig. 11). A l'intérieur de l'anthéridie, qui s'est ainsi vidée de la plus grande partie de son contenu, on voit une petite portion de protoplasme (pl. V, fig. 11 et pl. VI, fig. 1), ce qui prouve que tout le contenu de cet organe n'est pas passé dans l'ooplasme.

L'oospore mûre. — Les deux noyaux, mâle et femelle, se fusionnent (pl. V, fig. 11) et ensuite le noyau de fécondation demeure en repos à l'intérieur de l'oospore dont la membrane s'épaissit (pl. V, fig. 12). On rencontre, à ce moment, du glycogène à l'état diffus dans le cytoplasme *in vivo*. La membrane externe peut être qualifiée d'exospore et l'on peut donner, à la couche plus dense, formant dépôt, située immédiatement en-dessous, et qui paraît constituer une membrane interne, le nom d'endospore (pl. V, fig. 12). On ne rencontre plus de vacuoles dans l'oospore à maturité.

Le chondriome. — Nous avons eu recours dans cette étude à la fixation par le liquide de Helly. On voit des mitochondries granuleuses et des bâtonnets. (Pl. IV, fig. 13 et 14). On peut obtenir des images superposables après fixation au liquide de Flemming fort (pl. V, fig. 4, 6 et 7).

CHAPITRE IV. — A PROPOS DE L'APPAREIL DE GOLGI

C'est en 1898 que GOLGI, par sa méthode d'imprégnation à l'argent, a mis en évidence, dans le cytoplasma des cellules nerveuses, la présence d'un réseau de filaments très fins auquel on a donné le nom d'appareil réticulaire de Golgi. CAJAL a, de son côté, fait l'étude de cet appareil.

KOPSCH, par une imprégnation osmique, a pu obtenir des préparations montrant aussi cet appareil. Par la suite, de nombreux auteurs, après action de l'acide osmique, ont obtenu dans les cellules animales des formations teintées en noir qui rappelaient les images décrites par GOLGI et par CAJAL. Ils ont montré la constance de ces formations qui peuvent, cependant, varier de forme. En effet, cet appareil peut se présenter sous l'aspect d'un réseau ou d'un groupe de fibrilles placées d'un côté du noyau ou l'entourant complètement. Souvent il est constitué par quelques petits éléments dispersés dans le cytoplasma et qui apparaissent comme des corps ronds ou ovoïdes constitués par une substance chromophobe, entourée d'une substance chromophile, souvent plus épaissie d'un côté que de l'autre. Ces éléments sont connus sous le nom de dictyosomes ou éléments de Golgi (GUILLIERMOND, 1935).

De nombreux zoologistes, tels BOWEN, GATENBY, MORELLE, BEAMS, admettent l'existence de corps de Golgi à l'intérieur des cellules animales, indépendamment du système vacuolaire et du chondriome. Pour eux ces éléments correspondent à un constituant important de la cellule. Les études sur ces formations de Golgi ont été surtout poursuivies à l'aide des méthodes d'imprégnation argentine ou osmique d'après Cajal, Golgi, Da Fano, Kopsch, Kolatchev et autres. Mais jamais on n'a pu contrôler sur les vivants l'existence de ces formations.

BOWEN (1926-1930), qui les a recherchées dans les cellules vé-

gétales, pense que leur homologue peut être rencontré, chez les végétaux, dans les corps qu'il appelle: «plaquettes osmiophiles». Il indique que celles-ci représentent vraisemblablement une nouvelle catégorie de constituants cellulaires, jusqu'ici passée inaperçue du fait qu'elle ne peut être mise en évidence que grâce à une imprégnation osmique et, suivant cet auteur, la méthode de Kolatchev est la plus propre à la manifester. Il ajoute que si cette méthode est correctement appliquée, les plaquettes osmiophiles sont nettement mises en évidence, en même temps que d'autres formations de nature inconnue. Il donne, d'ailleurs, des conseils précis sur l'emploi de la technique qui doit être suivie, pour que réussite s'en suive, dans les plus minutieux détails. Un certain nombre d'auteurs, tels PATTEN, SCOTT et GATENBY (1928), se rallient à l'opinion de BOWEN.

GUILLIERMOND et ses élèves se sont, de leur côté, beaucoup occupés, de 1922 à 1935, de cette question et ont effectué un grand nombre de recherches sur des matériaux très divers, à l'aide des méthodes habituelles et aussi des colorations vitales. Dans ses deux ouvrages récents, GUILLIERMOND a fait une mise au point de cette importante question.

Cet auteur a montré que les imprégnations argentiques peuvent imprégner exclusivement le chondriome et, dans ce cas, l'imprégnation est la même pour les plastes que pour les chondriosomes proprement dits, qui ne sont généralement pas déformés et demeurent aisément reconnaissables (*Saprolegnia*, racine de Blé, etc.). Parfois le noyau, à l'exception de son nucléole, est seul imprégné (*Saprolegnia*, Levures) ou encore les chromosomes en mitose (racine de Blé). D'ordinaire, cependant, cette méthode décèle exclusivement le système vacuolaire, dont le contenu est capable de réduire l'argent qui est précipité en filaments ou en réseau, donnant l'apparence d'un appareil de Golgi. Dans les cellules âgées, où les petits éléments du système vacuolaire ont conflué et formé de grosses vacuoles, l'argent est précipité sur les granulations résultant de la précipitation des colloïdes vacuolaires par le liquide fixateur. Ces précipités métalliques peuvent prendre l'aspect de croissants dans les vacuoles de taille moyenne (dictyosomes) ou d'un réseau dans les vacuoles les plus grandes. Les images obtenues correspondent donc en tous points à celles que donne une coloration vitale par le rouge neutre.

Dans ses recherches à l'aide de l'imprégnation osmique, GUILLIERMOND a constaté que si la durée en était courte, par exemple de 8 jours, les chondriosomes sont bien conservés et fortement colorés. Quelques-uns apparaissent gonflés, parfois il y a fragmentation des chondriocontes en plus petits bâtonnets ou en mitochondries (*Saprolegnia*, *Geotrichum lactis*, racines de Blé et de Jacinthe).

Dans les imprégnations de plus longue durée (15 jours), il arrive, dit l'auteur, que, le plus souvent, le noircissement n'est pas limité au chondriome et porte aussi sur le système vacuolaire ; mais, lorsque le chondriome est noirci, les éléments de ce système présentent presque toujours des altérations très importantes. Parfois, ils sont seulement très gonflés : les mitochondries apparaissent sous forme de gros grains et les chondriocontes présentent, sur leur trajet, une série de renflements plus ou moins marqués, ou sont fragmentés en grains et en bâtonnets épars ou en éléments en forme de massues. Les transformations peuvent être de diverses sortes, parfois les vésicules formées par les chondriocontes présentent alors l'aspect tout à fait caractéristique des dictyosomes décrits dans les cellules animales, avec une mince pellicule chromophile, qui s'épaissit généralement sur un côté, et une partie centrale, chromophobe. Ces vésicules peuvent éclater et prendre l'aspect de corps en forme de croissants ou d'écailles également semblables à beaucoup de dictyosomes et aux « plaquettes osmiophiles » de BOWEN et GATENBY, (*Saprolegnia*, *Geotrichum lactis*, racines de Haricot, de Courge, de Pois, bourgeons d'*Elodea canadensis*, etc.).

A l'intérieur des vacuoles, l'osmium est précipité d'une façon à peu près analogue à celle de l'argent.

Dans certains cas, le système vacuolaire est seul imprégné, et dans d'autres ni lui, ni le chondriome ne le sont, mais le cytoplasme est entièrement noirci et prend une structure fibrillaire. Ces imprégnations sont très irrégulières.

En conclusion de ses recherches, GUILLIERMOND montre qu'en dehors des granulations lipidiques ou microsomes, il n'existe dans le cytoplasma des cellules végétales aucune formation permanente autre que le chondriome (plastides et chondriosomes proprement dits) et le système vacuolaire. Il n'y a donc rien en dehors d'eux qui puisse être rapporté à l'appareil de Golgi.

PARAT (1928) étudiant les cellules animales est parvenu aux

mêmes conclusions que GUILLIERMOND et il pense que les formations, décrites dans les cellules animales comme représentant l'appareil de Golgi, paraissent se rapporter souvent à un vacuome semblable à celui des cellules végétales, beaucoup d'entre elles aussi semblent correspondre à des images déformées du chondriome ou à une superposition du chondriome et du vacuome.

BOSE (1931) étudiant divers Polypores et Agarics est arrivé à cette conclusion que les « plaquettes osmiophiles » (éléments de Golgi) de BOWEN ne sont autre chose que des chondriosomes altérés ayant subi des transformations dues à l'action irrégulière de l'acide osmique sur les cellules végétales.

A cet égard, il est intéressant de noter l'opinion d'une autre botaniste, WEIER (1930-33), qui a examiné divers Bryophytes et a également utilisé la coloration au rouge neutre. Elle incline à penser que les plastes des cellules végétales sont homologues des corps de Golgi rencontrés dans les cellules animales.

BOWEN (1926) avait, du reste, partagé un moment cette opinion. Récemment DUBOSCQ et GRASSÉ (1933) ont admis que les plastes des végétaux chlorophylliens, l'idiozome des cellules animales et l'appareil parabasal des Flagellés rentreraient dans la catégorie des éléments de Golgi.

Mais cette opinion n'est pas admissible étant donné que les chondriosomes sont aussi bien imprégnés que les plastes par les méthodes golgiennes et que les plastes sont une catégorie spéciale de chondriosomes propres aux végétaux verts et en relation directe avec la photosynthèse et font défaut dans les Champignons et dans les cellules animales.

Recherches personnelles

Nous avons personnellement examiné le mycélium des *Pythium* et aussi les organes sexuels de *P. deliense*, à l'aide de la méthode de Kolatchev, en suivant la technique de Bowen dans ses plus infimes détails et aussi en effectuant des colorations vitales au rouge neutre. Nous avons obtenu de bons résultats dans tous les cas. Avec l'acide osmique à 2% on réalise une coloration peu foncée. Quant à la température à laquelle le matériel doit être maintenu, qu'il s'agisse de 35 ou de 40°C, cela n'a pas paru avoir d'importance. D'ordinaire

une imprégnation de 5 jours a semblé suffisante, les résultats étant comparables après 7 ou 8 jours, mais nous n'avons jamais excédé 10 jours.

Dans les organes sexuels, on rencontre des corps colorés en noir de forme et de taille diverses, nettement localisés dans les vacuoles incolores (Pl. IV, fig. 9-11). Les images obtenues correspondent donc en tous points à celles que donne une coloration vitale par le rouge neutre. En deux endroits (pl. IV, fig. 10 et 11), on pouvait voir le noyau dans l'oogone, mais il n'apparaissait pas en noir. Dans le cytoplasma des organes sexuels on ne distinguait généralement aucune autre structure.

Les mêmes aspects ont été retrouvés dans le mycélium des quatre Champignons étudiés (pl. IV, fig. 10 et 15). Parfois aussi, (pl. II, fig. 20) nous avons rencontré de petits anneaux dont le pourtour était coloré en noir, tandis que le centre demeurait incolore. Ces formations ressemblent aux plaquettes osmiophiles de BOWEN et de GATENBY. A d'autres endroits, on trouve des bâtonnets colorés en noir. Dans le même filament, mais de place en place seulement, ces deux sortes de formations se trouvent côte à côte avec de petits bâtonnets dont les extrémités se sont renflées ou vésiculisées. En examinant le chondriome de ces Champignons, nous avons obtenu des préparations comparables avec les méthodes mitochondriales et la coloration vitale (pl. II, fig. 2, 13, 14 et 17). Il ne fait aucun doute qu'il s'agit de chondriosomes ayant subi des altérations. BOWEN (1929-30) a lui-même admis qu'en même temps que les plaquettes osmophiles, on rencontre des structures noircies, dues à l'action d'agents inconnus. La véritable interprétation de ces structures, obtenues par les imprégnations osmique et argentique, a été donnée par GUILLIERMOND (1935) qui a montré que ces méthodes peuvent conserver les éléments du chondriome, soit normaux, soit altérés de diverses manières, le noyau et les chromosomes, tous prenant une teinte noire, et peuvent aussi noircir le système vacuolaire; qu'en outre elles peuvent déterminer d'autres modifications ou altérations.

Notons, en terminant, que nous avons réalisé, même après 8 jours, une excellente imprégnation du système vacuolaire qui, dans les organes sexuels, était seul coloré. Dans les hyphes, par contre, de place en place, des chondriosomes étaient, en outre,

noircis, quelques-uns même étaient altérés ; parfois enfin seul le chondriome était respecté. Ceci montre bien à quel point les imprégnations osmiques donnent des résultats irréguliers et que les méthodes golgiennes n'ont aucune spécificité.

Dans nos Champignons, par conséquent, il n'existe aucune formation, en dehors du chondriome et du système vacuolaire, qui puisse être rapportée à l'appareil de Golgi et nous faisons nôtres les conclusions tirées par GUILLIERMOND de ses récents travaux (1935).

CHAPITRE V. — DISCUSSION GÉNÉRALE

Avant d'exposer brièvement les principaux résultats auxquels nous sommes parvenu au cours de cette étude, nous voudrions discuter les opinions des cytologistes s'étant occupés des Champignons inférieurs et les confronter avec celles que nous avons acquises à la suite de nos recherches. Nous envisagerons ainsi successivement : le noyau au repos avec ses divers constituants morphologiques, les organes sexuels, leur formation, leur morphologie et leur cytologie.

1^o Les noyaux au repos.

a) *Le nucléole*. — Il est incontestable que les noyaux des jeunes oogones sont légèrement plus grands et possèdent davantage de chromatine que ceux du mycélium végétatif. KING (1904, p. 217) avait exposé cette idée en ces termes à propos de *Arayospora pulchra* : « les noyaux végétatifs sont apparemment plus pauvres en chromatine car leurs nucléoles, invariablement, sont plus apparents que ceux des noyaux des zoosporanges ou des organes sexuels ». Dans les noyaux au repos du mycélium des 4 *Pythium* examinés, et aussi des organes sexuels, on rencontre toujours un énorme nucléole central qui se colore intensément. Parmi les autres auteurs qui se sont occupé de la cytologie des *Pythium*, seul EDSON (1915) a décrit un nucléole ; il dit, qu'à l'intérieur du présporange, on trouve un certain nombre de noyaux et que le noyau, à ce stade, est sphérique ou ovalaire, qu'il possède un nucléole unique généralement placé sur le côté, souvent même faisant hernie (pl. XLVI, fig. 1 à 8 de l'auteur). Parfois, spécialement dans les zoospores, le noyau renferme deux, voire trois nucléoles. Personnellement nous n'avons jamais

rencontré de noyau ayant cet aspect et pas davantage n'avons-nous vu plusieurs nucléoles à l'intérieur du noyau.

Chez *P. de Baryanum*, MIYAKE (1901) n'a pas constaté la présence de nucléoles, mais uniquement celle de granulations chromatiques apparentes, se transformant en un certain nombre de chromosomes au moment de la mitose. Cependant, chez le même objet, j'ai rencontré un nucléole nettement visible. D'autre part, chez *P. torulosum*, PATTERSON (1927) dénomme le corps rencontré au centre du noyau « masse chromatique ». L'opinion de TROW (1901), à propos de cet élément, est que le corps qui se colore intensément, et que l'on voit au centre du noyau, ne peut pas être considéré comme un simple nucléole. Il pense, en effet, que si ce corps devait être considéré comme un nucléole, ce serait alors un nucléole géant et il ajoute que si de tels éléments existaient chez les végétaux supérieurs, ils seraient fort intéressants à étudier, mais, en fait, il en a en vain cherché. Il poursuit en disant : ma conception actuelle au sujet de ce corps énigmatique, que je considérerais provisoirement en 1895 comme un chromosome, peut être exprimée de la façon suivante. Il suffirait de se représenter un nucléole, de *Lis* par exemple, qui augmenterait considérablement de volume jusqu'à occuper la moitié de la cavité nucléaire et engloberait, sans les repousser, les granulations chromatiques éparses sur le réseau, ce dernier y compris. Par conséquent, pour cet auteur, le corps en question peut être considéré comme un nucléole augmenté d'une certaine portion de chromatine et non, de toute façon, comme un simple nucléole.

Mais on sait maintenant que, chez les végétaux supérieurs, lorsque le noyau est destiné à donner des chromosomes de petite taille, il possède un unique nucléole central et volumineux et, parmi les auteurs modernes, EICHHORN (1933, 1933 a, 1934, 1934 a, 1934 b) a décrit chez de nombreux végétaux (*Cucurbitacées*, *Sinapis*, *Gossypium*, *Lathrea*) des aspects de ce genre et de même GHIMPU (1930) chez *Acacia*. Dès 1913, GUILLIERMOND s'exprimait ainsi à propos du noyau des Champignons : « Ce noyau présente les caractères des noyaux ordinaires des végétaux supérieurs. On y distingue un nucléoplasme incolore, limité par une membrane colorable, un nucléole et de la chromatine sous forme d'un fin réseau ou de petits grains très difficiles à mettre en évidence dans les cas où le noyau est très petit, comme cela arrive généralement dans le mycélium végé-

tatif». Ceci nous dispensera de citer les opinions d'autres auteurs antérieurs à 1913; disons simplement que tous ou, presque tous, donnaient à ce corps le nom de nucléole et que, dès 1903, DAVIS réfutait les conclusions de TROW. Actuellement encore, on continue à le considérer comme étant un nucléole (CARLSON, 1929; COOPER, 1929; COUCH, 1932). On retiendra spécialement, parmi les auteurs modernes s'étant occupé du noyau des Champignons, SMITH (1923) qui a constaté l'existence d'une amitose pour les noyaux végétatifs de *Saprolegnia*. Cet auteur ne donne, toutefois, pas le nom de nucléole au corps placé au centre du noyau et dit : la masse centrale est composée surtout de chromatine et paraît être un nucléole. On peut la comparer à celle rencontrée dans les noyaux végétatifs de *Penicillium* et à laquelle GUEGEN (1898-99) a donné le nom mal défini de chromoblaste, ceci d'autant plus que le rôle de ce corps n'est pas connu jusqu'ici.

Récemment DANGEARD (1931) a décrit comme étant un nucléole le corps central de *P. muscae*. Ce corps central doit être appelé nucléole, conformément à l'opinion de la majorité des auteurs.

D'ailleurs, le rôle du nucléole n'est pas déterminé quant à présent. D'une façon générale, on n'admet pas sa participation, chez les Champignons, à la formation des chromosomes, sauf une minorité de chercheurs qui n'admettent pas que cet élément puisse être rejeté dans le cytoplasme (COUCH, 1932, p. 192).

Quant à son évolution chez *P. deliense*, on peut penser qu'il ne persiste pas au delà de la prophase. A ce stade il apparaît déjà localisé contre la membrane nucléaire et diminué de volume (pl. III, fig. 10); on perd toute trace de ce corps à la métaphase. A vrai dire, chez nombre d'autres Champignons, il persiste jusqu'à la fin de ce stade. Mais ici on peut admettre qu'il disparaît par dissolution au cours de la prophase.

b) *La membrane nucléaire.* — Suivant TROW (1901), le fuseau est intranucléaire chez *P. ultimum*, la membrane nucléaire étant visible jusqu'à la métaphase, mais ne pouvant être décelée au delà, tandis que MIYAKE (1901), chez *P. de Baryanum*, n'a pu la mettre en évidence qu'aux premiers stades de la division. Sans doute chez *P. deliense* et *P. torulosum* cette membrane disparaît-elle plus tôt que chez les deux autres espèces, soit à la fin de la prophase. De toute façon, après l'apparition du fuseau, nous n'avons jamais

pu la déceler. On voit combien les *Pythium* diffèrent, de ce point de vue, des autres Champignons. Dans un très grand nombre de cas, en effet, le fuseau en métaphase est nettement situé à l'intérieur d'une membrane (1).

Chez *P. deliense* la membrane nucléaire réapparaît à la télophase.

Chez aucune des espèces de *Pythium*, sauf *P. torulosum* il n'y a de centrosomes.

2° Les organes sexuels.

On sait que, dans tous les *Pythium* étudiés par nous, lorsque les organes sexuels ont atteint un degré de maturité suffisant, ils se séparent des hyphes qui les portent par une cloison transversale. Chez *P. torulosum*, PATTERSON (1927) a montré que cette séparation s'effectue lorsque les noyaux ont achevé leur division. Celle-ci est d'ailleurs unique. *P. aphanidermatum* fait exception, car (EDSON 1915) les noyaux, chez cette espèce, se divisent mitotiquement à l'intérieur du mycélium et passent ensuite à l'intérieur des organes sexuels où ils ne se divisent plus.

a) *Disposition des noyaux*. — Chez *P. ultimum*, de *Baryanum* et *torulosum*, les noyaux se rangent d'abord à la périphérie des organes, avant de se diviser. Chez *P. aphanidermatum*, ils prennent une position comparable, mais ils ne se divisent pas. Chez *P. deliense* étudié ici ils sont, par contre, répartis irrégulièrement dans le jeune oogone, et se divisent à ce moment. C'est après leur division seulement qu'ils sont repoussés vers la périphérie par les vacuoles néoformées. Cette disposition prise antérieurement à toute division rappelle les phénomènes rencontrés par KRUGER (1910) chez *Albugo candida*.

Au centre de l'oogone aucun noyau ne persiste chez *P. deliense*, *P. de Baryanum* ou *P. aphanidermatum*, mais chez *P. ultimum* et *P. torulosum* il en persiste un, qui se divise. Ceci a peu d'importance

(1) *Saprolegnia* (DAVIS, 1903-1905 ; CLAUSEN, 1908) ; *Achlya* (TROW, 1899 ; CARLSON, 1929) ; *Cystopus* (WAGER, 1896 ; STEVENS, 1899-1901 ; DAVIS, 1901) ; *Peronospora* (BERLESE, 1897 ; WAGER, 1900) ; *Phytophthora* (MURPHEY, 1918) ; *Leptolegnia* (COUCH, 1932).

en soi, car il n'y a finalement qu'un seul noyau femelle qui devient fonctionnel (KRUGER, 1910).

TROW n'a jamais rencontré de vacuole centrale à aucun stade du développement de l'oogone et nous avons constaté qu'il en va de même chez *P. deliense*. Chez *P. torulosum*, avant la fécondation, l'ooplasme se vacuolise et une grande vacuole centrale apparaît. Chez *P. aphanidermatum*, EDSON a constaté la formation d'une cavité excentrique dans l'oogone de telle sorte que les noyaux sont repoussés vers la périphérie.

Chez *P. deliense* nous avons montré que les noyaux sont rejetés à la périphérie par suite de la formation, de la fusion et des mouvements des vacuoles et je pense que le même phénomène se produit chez *P. ultimum* et *P. de Baryanum*. De toute façon, l'on ne rencontre pas de grande vacuole centrale dans aucune de ces espèces, à aucun moment. Cette conclusion est, d'ailleurs, basée sur une étude à l'aide de colorations vitales au rouge neutre.

b) *Différenciation du protoplasma à l'intérieur de l'oogone en périplasma et ooplasme.* — Dans tous les cas examinés, cette différenciation s'opère à un stade assez avancé, d'une façon générale plus tardivement que chez *Cystopus* ou *Peronospora*, où elle a lieu juste au moment de la division des noyaux ou un peu auparavant. Chez tous les *Pythium* étudiés jusqu'ici, elle s'effectue après la mitose (MIYAKE, PATTERSON) ou après que les noyaux ont gagné la périphérie (TROW). Ce dernier auteur (1901) a constaté que, chez *P. ultimum*, la disposition des noyaux en un anneau annonce la division de l'oogone en ooplasme et périplasma. Chez *P. deliense* étudié par nous celle-ci n'a lieu qu'après la mitose et lorsque les noyaux ont pris leur position périphérique. EDSON, de son côté, ne fait pas mention de ces phénomènes.

Le périplasma dans toutes ces espèces est peu abondant et souvent difficile même à mettre en évidence. Quant à son rôle, il est très controversé, mais il est un fait certain, c'est que, y compris les noyaux qu'il englobe, il ne persiste pas bien longtemps et disparaît à peu près au moment de la fécondation.

c) *Le cœnocentre.* — La structure que nous venons de décrire chez *Pythium* a été vue pour la première fois en 1896 par WAGER chez *Cystopus candidus* où cet auteur a montré l'existence d'une

masse centrale dense, fait de protoplasma granuleux, nettement distincte à l'intérieur de l'oogone. En 1899, STEVENS chez *Cystopus Bliti*, a indiqué, au moment de la vacuolisation de l'oosphère, la formation d'un corps central homogène, constitué grâce à la condensation graduelle d'une masse de cytoplasme granuleux au centre, ou à peu près, de l'oosphère. Cette zone paraissait prendre une coloration plus intense que le cytoplasma environnant. On lui a donné le nom de *cœnocentre* et on lui a attribué un rôle attractif.

En 1900, WAGER, chez *Peronospora parasitica* a décrit les mêmes images. DAVIS, en 1903, a donné quelques détails au sujet de cette formation chez *Saprolegnia*. Il la considère comme une sorte d'aster et il voyait là « l'expression morphologique d'activités dynamiques ».

En 1904, TROW examinant *Achlya de Baryanum* critique les recherches de ses prédécesseurs sur ce sujet. Il décrit, dans l'oogone, des centrosomes, avec des asters, apparaissant au moment de la mitose et il pense que ce sont ces derniers que DAVIS a pris pour des cœnocentres. Lui-même, cependant, en 1901, dans une étude sur *P. ultimum*, avait décrit, au centre de l'œuf, une masse protoplasmique se colorant plus fortement que les autres parties de l'organe et l'avait dénommée cœnocentre, mais il avait indiqué expressément qu'il n'adoptait ce terme que pour la commodité de l'interprétation.

Postérieurement à ces travaux, il a été publié de nombreuses études contradictoires au sujet de la présence ou de l'absence de ce corps et aussi de son rôle. Nous n'en citerons encore que quelques exemples, en choisissant le genre *Achlya*. TROW (1904) ne rencontre pas de cœnocentre chez *A. de Baryanum*, mais indique la présence d'une autre formation : l'oocentre. COOPER (1929), chez *A. hypogyna*, voit bien un corps que l'on pourrait qualifier de cœnocentre, mais il note qu'il est assez rarement présent. CARLSON (1929) indique, de son côté, l'existence, chez *A. racemosa*, d'un corps colorable en noir et qui ressemble à des asters.

Le cas le plus intéressant est encore celui d'*Albugo candida*. En 1900, DAVIS et, en 1901, STEVENS, étudiant cette espèce, ont constaté l'existence d'un cœnocentre ; par contre KRUGER, en 1910, ne trouve rien de comparable.

Chez *P. ultimum*, TROW (1901) a vu, dans l'œuf, une masse de

protoplasma se colorant plus intensément que les autres portions. MIYAKE (1901) chez *P. de Baryanum* n'a pas rencontré de parties différenciées dans le protoplasma. EDSON (1915) a vu, chez *P. aphanidermatum*, de même que TROW, une zone centrale qui se colore différemment du reste. Seul PATTERSON (1927) appelle cette zone cœnocentre chez *P. torulosum* (cf. MATTHEWS, 1931).

Chez *P. deliense* nous avons constaté que l'ooplasme se différencie en une plage offrant une coloration foncée, le *centralplasme* et une partie périphérique vacuolisée. Il est certain que l'on trouve dans les préparations mal différenciées une tache noire en relation avec le noyau femelle, au centre de l'organe, mais il ne faut voir là qu'un défaut de différenciation et un excès d'hématoxyline. Lorsque l'on applique la méthode de Kolatchev, et que l'on colore à l'érythro-sine, un léger excès de colorant persiste toujours aussi sur le central-plasme. Quand le noyau femelle est sur le point de gagner le centre, il est évident que le protoplasme, dans le centralplasme, est plus dense et plus granuleux et ceci tient, d'après moi, à ce qu'il afflue en cet endroit des substances nutritives dissoutes destinées à nourrir le noyau femelle. Une coloration plus foncée apparaît alors en ce point et tranche sur la coloration plus pâle du cytoplasma environnant. Nous avons tenté de représenter ces différences dans nos dessins, mais nous tenons à préciser que le centralplasme n'apparaît pas en noir dans nos préparations.

Une question se pose, celle de savoir comment le noyau femelle gagne toujours, chez toutes les Saprolegniales et les Pérénosporales étudiées de ce point de vue, la partie centrale. Une coloration vitale, chez *P. deliense*, montre l'apparition, la fusion et certains déplacements de vacuoles et il est vraisemblable que c'est à ces divers mouvements que l'on doit attribuer les changements de position du noyau femelle, de même que ceux des noyaux qui se déplacent vers la périphérie, à des stades antérieurs. EDSON déjà, écrivait de son côté : il paraît plus logique d'admettre que les mêmes forces qui amènent les vacuoles centrales à accumuler du protoplasme plus dense continuent à agir et que l'accumulation d'un matériel plus dense, formant le corps qui rappelle un cœnocentre, le retour du noyau femelle et la marche du noyau mâle, tout comme l'accumulation ultérieure de substances nutritives au centre de la spore, ne sont que des manifestations de cette même force. COOPER (1929)

disait aussi : d'une observation continue de la formation des œufs, et du peu de fréquence d'apparition d'un cœnocentre, j'incline à penser que ce dernier n'est pas un agent actif. Mieux vaut chercher celui-ci dans la vacuole centrale. Je suis entièrement d'accord sur ces points avec ces auteurs.

J'ai indiqué déjà que certains attribuaient une force dynamique ou attractive au cœnocentre pour attirer les noyaux femelle et mâle (KING, 1904). On peut poser aux partisans de cette théorie la question suivante : comment se fait-il qu'au premier stade du développement les noyaux émigrent à la périphérie et à quelles forces obéissent-ils alors ?

MURPHY (1918), chez *Phytophthora*, n'a pas rencontré de cœnocentre nettement individualisé, mais simplement une masse irrégulière de cytoplasma légèrement plus dense qu'il dénomma « centralplasme ». Mais il ne l'a pas toujours trouvé. Chez *Peronospora*, WAGER (1900) et RUHLAND (1904) ont vu un cœnocentre, tandis que KRUGER (1910) n'a distingué qu'une petite masse irrégulière de cytoplasma parfois située au centre, et qu'il dénomma : *Zentralplasm*.

La vérité paraît être ceci : il existe généralement dans l'ooplasme une partie centrale qui se colore intensément et la dénomination qu'on lui attribue est bien indifférente, qu'il soit question d'un cœnocentre, d'un ovocentre, d'un centralplasme, etc. J'ai emprunté cette dernière appellation à MURPHY (1918) parce qu'elle indique la position de cette zone particulière de cytoplasma et ne comporte pas, à l'inverse des termes choisis par STEVENS, DAVIS, KING, etc., une idée sur son activité, activité que je ne lui reconnais du reste pas.

DAVIS pense que ce corps disparaît après la fécondation et ceci se conçoit. Lorsque le noyau femelle a été fécondé par le noyau mâle, le noyau de fécondation de l'oospore entre en repos et il s'accumule dans le cytoplasma, sous forme d'un globule de réserve, les éléments nécessaires pour l'entretien ultérieur du noyau et pour la germination des spores.

d) *Gonoplasme et périplasme dans l'anthéridie*. — Un autre point important réside en ceci qu'à l'intérieur de l'anthéridie, il n'y a pas différenciation du protoplasme en gonoplasme et périplasme,

chez *P. deliense* étudié ici, comme le pensait DE BARY et d'autres auteurs. Ceci vaut d'ailleurs pour les autres espèces étudiées jusqu'ici. Il est au surplus certain que tout le contenu de l'anthéridie ne passe pas dans le tube de fécondation jusqu'à l'intérieur de l'oosphère chez *P. deliense*. D'ordinaire, le contenu presque tout entier s'écoule et il n'en reste que très peu à l'intérieur de l'anthéridie vidée. Ce passage s'effectue rapidement et ne dure pas de toute façon de 1 à 2 heures comme l'a indiqué DE BARY.

e) *La membrane de l'oospore.* — La membrane de l'oospore est épaisse, ce qui est général chez les *Pythium*, moins toutefois que ne l'a indiqué MURPHY (1918) chez *Phytophthora erythroseptica*. Elle est constituée par deux couches ; l'une externe, connue sous le nom d'exospore et l'autre, plus épaisse, l'endospore.

f) *Le globule de réserve.* — Le globule de réserve est désigné comme de nature lipidique par MIYAKE, alors que TROW le considère comme un complex d'huiles et de protides. Chez *P. deliense*, après la fécondation, il semble qu'il existe du glycogène à l'état diffus dans le cytoplasma. Il n'a pas été possible, toutefois, de préciser la nature chimique de ce corps dans ce Champignon

3° Le chondriome.

Les éléments du chondriome ont été figurés uniquement chez *P. aphanidermatum* par EDSON, mais chez les espèces où je les ai étudiés ils ne sont pas aussi épais que ne l'a figuré EDSON. On en trouve toutefois de tels chez *P. de Baryanum* (pl. III, fig. 11) et qui ressemblent à quelques-uns de ceux rencontrés par GUILLIERMOND (1920 b) dans les Saprologéniacées et qu'il a décrit comme ayant l'aspect de fuseaux. Les chondriocones chez ces Champignons ne sont pas généralement aussi allongés que chez *Saprolegnia* ou le *Penicillium glaucum* (GUILLIERMOND 1934 a). DANGEARD (1931) a indiqué que, chez *Pythium muscae*, les éléments du chondriome, qu'il appelle cytome, apparaissent le plus généralement sous forme de cytosomes sphériques, mais les aspects en bâtonnets courts paraissent plus nombreux que sur le vivant, comme si la fixation avait eu pour effet de produire l'étirement de quelques-uns d'entre eux, ce qui est en contradiction avec les données classiques. Les images

des cytosomes sphériques, représentées par DANGEARD, ressemblent exactement aux structures que j'ai obtenues dans les préparations du mycélium de ces Champignons et qui ont été décrites comme des altérations (cavulations) des chondriocotes. Il n'est donc pas douteux que les cytosomes sphériques décrits par DANGEARD ne sont, sur le vivant, autre chose que des chondriocotes altérés sous l'action de l'eau et que les bâtonnets observés après fixation correspondent, au contraire, à la forme réelle des chondriosomes.

4^o Le système vacuolaire.

J'ai constaté que le rouge neutre à faible dose n'est pas toxique pour ces Champignons qui continuent à croître et à donner des organes sexués lorsque le colorant est ajouté aux milieux. Le système vacuolaire se colore pendant le développement des Champignons. Les précipités intra-vacuolaires ne sont pas constitués par de la méta-chromatine. A hautes doses le rouge neutre devient toxique et retarde le développement. Ces faits concordent avec ce qu'a indiqué GUILLIERMOND à propos de *Saprolegnia* (1929 a, 1930 b et c).

CHAPITRE VI. — POSITION SYSTÉMATIQUE
DE QUELQUES ESPÈCES DU GENRE *PYTHIUM*
D'APRÈS LES DONNÉES CYTOLOGIQUES.

Parmi les 5 Champignons sur lesquels ont porté notre discussion *P. aphanidermatum* et *P. deliense* paraissent moins évolués que *P. ultimum*, de *Baryanum* et *torulosum*, me semble-t-il. Chez les deux premiers la division nucléaire s'opère avant que les noyaux ne se disposent à la périphérie de l'oogone, alors que chez les trois derniers la mitose ne commence d'ordinaire qu'après que cette disposition à été prise.

1° Chez *P. aphanidermatum*, la mitose qui, chez les autres types, s'opère à l'intérieur des organes sexuels, s'effectue dans le mycélium avant que les noyaux émigrent dans ces organes. Chez *P. deliense*, bien que les noyaux se divisent, avant la fécondation, à l'intérieur des organes sexuels, ils ne se rangent pas en un cercle vers la périphérie au moment de cette division. Ils demeurent irrégulièrement répartis dans le cytoplasma du jeune oogone et c'est dans cette position qu'ils se divisent. Il semble que le fait qu'une division nucléaire ait lieu à l'intérieur des organes sexuels et non plus dans les organes végétatifs exclusivement, comme chez *P. aphanidermatum*, puisse être regardé comme un progrès sur les conditions rencontrées chez celui-ci et que, pour cette raison, *P. deliense* doive être considéré comme plus évolué. Morphologiquement du reste ceci est vrai aussi, car, chez *P. aphanidermatum*, les sporanges filamenteux sont digités, lobés et d'une longueur de 50 à plus de 1.000 μ . Chez *P. deliense*, par contre, les sporanges sont d'ordinaire filamenteux et atteignent jusqu'à 210 μ de long, mais leur formation, comme celle des oospores, n'est pas habituelle, puisque la reproduction sexuelle prédomine.

SIDERIS (1931) désigne *P. aphanidermatum* sous le nom de *Nematosporangium aphanidermatum* et sa section *Oligandra* se subdivise de la façon suivante :

Oligandra :

a) *Plethorocomba*, nombreuses plasmatoogoses, donnant des zoospores dans l'eau, indiquant que ce sont des organismes hydrobiotiques.

1. *N. aphanidermatum*.
2. *N. aphanidermatum* var. *hawaiiensis*.
3. *N. Butleri*.

b) *Oligocomba*, peu de plasmatoogoses donnant rarement des zoospores, ce qui indique leur nature aérienne ou terrestre.

1. *N. indigoferae*.

De plus, les espèces de la section *Oligocomba* donnent des oospores plus abondamment que celles de la section *Plethocomba*. *P. deliense* (*Nematosporangium deliense* d'après SIDERIS) produit également un grand nombre d'oospores. Les zoospores sont rares. Aussi d'après SIDERIS devrait-on ranger cette espèce dans la section *Oligocomba*, près de *N. indigoferae*. MEURS (1934) a, de son côté, émis l'idée que *P. deliense* serait très proche de *P. indigoferae*. Il n'est pas douteux que cette dernière espèce est, de toute façon, plus évoluée que *P. deliense*, car elle est épiphyte (BUTLER, 1907).

D'après SIDERIS également, *N. aphanidermatum* est plus primitif.

Par contre, dans les trois autres cas (*P. ultimum*, *P. de Baryanum* et *P. torulosum*), les noyaux, d'ordinaire, se disposent plus ou moins en un anneau auprès de la périphérie et ensuite se divisent.

Nos conclusions à savoir que *P. aphanidermatum* et *P. deliense* sont moins évolués que les trois autres *Pythium* sont confirmées par des caractères morphologiques. Le genre *Pythium* (BUTLER, 1907, FITZPATRICK, 1930) est généralement subdivisé en deux sous-genres : *Aphragmium*, dans lequel les sporanges sont filamenteux et souvent digités et *Sphaerosporangium* où les sporanges sont généralement sphériques ou ovoïdes. *P. aphanidermatum* qui possède des sporanges filamenteux digités rentre dans le premier sous-genre. *P. deliense* devrait y être compris aussi, en raison de ses sporanges généralement filamenteux, à côté de *P. indigoferae* que l'on range

dans le sous genre *Aphragmium*. Les trois autres espèces : *ultimum*, *de Baryanum* et *torulosum* sont placées dans le sous-genre *Sphaerosporangium* dont l'évolution est plus avancée que pour *Aphragmium*.

2° *P. torulosum* paraît être, du point de vue cytologique, plus primitif que les deux autres (*P. de Baryanum* et *P. ultimum*). Les cloisons délimitant les organes sexuels apparaissent très tardivement. « Dans l'ébauche de l'oogone tous les noyaux, sauf un qui demeure au centre, se rangent en cercle, après quoi tous se divisent. Une division simultanée s'effectue dans l'ébauche d'anthéridie. Aussitôt après cette mitose des cloisons apparaissent qui délimitent les organes sexués » (MATTHEWS, 1931). Cette formation tardive représente, sans aucun doute, un caractère primitif.

Au sujet de *P. de Baryanum*, MIYAKE (1901) écrit : « tandis que les noyaux se rangent à la périphérie de l'oogone, la partie centrale se vacuolise plus ou moins. Après la division des noyaux le contenu protoplasmique tout entier se différencie en ooplasme et périplasme ». Et plus loin : « bientôt après le passage du contenu de l'anthéridie à l'intérieur de l'oosphère une mince membrane entoure celle-ci... à ce stade seulement une faible portion de protoplasme demeure encore dans le périplasme ». Au sujet de *P. ultimum*, TROW (1901) montre que l'arrangement des noyaux en un cercle annonce la différenciation du contenu de l'oogone en ooplasme et périplasme. Il convient de noter qu'à ce moment les noyaux ne se sont pas divisés. Cet auteur parle de la mitose un peu plus loin : dans la figure IX, la formation de l'œuf a commencé, le tube de fécondation est au contact d'un protoplasma dense et la disposition annulaire des noyaux est très caractéristique. Ces noyaux sont en métaphase. D'après la description qu'il nous donne du périplasme, il semble que celui-ci persiste plus longtemps que chez *P. de Baryanum*, il dit, en effet : « tout le périplasme est digéré et absorbé par la jeune oospore, qui augmente alors considérablement de taille ».

On voit par tout ce qui précède que, chez *P. de Baryanum*, comme aussi chez *P. torulosum*, la différenciation du protoplasme de l'oogone en périplasme et ooplasme s'effectue après la division des noyaux, différenciation qui a lieu plus tardivement que chez *P. ultimum*. Un second point à noter est celui-ci : chez *P. de Baryanum*, le périplasme ne persiste pas aussi longtemps que chez

P. ultimum. En conséquence, *P. de Baryanum* apparaît, cytologiquement, plus primitif que *P. ultimum*. Il n'en reste pas moins vrai que, morphologiquement, *P. ultimum* paraît plus évolué ; il ne présente plus en effet de sporanges et de zoospores et BUTLER (1907) le place après *P. de Baryanum*.

Sans doute pour asseoir de telles conclusions, des recherches complémentaires devront-elles être entreprises sur d'autres espèces de *Pythium*.

MURPHY (1918) a suggéré l'idée que la différenciation en ooplasme et périplasme avant la fécondation s'effectuerait dans l'ordre ascendant suivant : *Pythium*, *Phytophthora*, *Sclerospora*, *Plasmopara*, mais il n'est pas aussi bien établi que pour *Peronospora*. Le travail de l'auteur, et celui plus récent de PATTERSON (1927), apporterait une confirmation de ces idées quant aux *Pythium*. Chez tous, le périplasme paraît être peu important et ne persiste pas longtemps, de même qu'il n'est pas très dense. Au sujet de *P. aphanidermatum*, EDSON (1915) ne dit rien sur ce point, mais dans ses figures 1, 2, 5 de la planche XLVII, la différenciation du contenu de l'oogone en périplasme et ooplasme est visible et le périplasme semble abondant. Chez *P. aphanidermatum* (EDSON, 1915), les noyaux se divisent très tôt, c'est-à-dire dans les hyphes parents, avant que les noyaux ne se soient disposés en un anneau vers la périphérie de l'oogone. Chez *P. deliense*, les noyaux se divisent d'abord et n'émigrent qu'ensuite à la périphérie, tandis que chez *P. de Baryanum* et *P. torulosum* ils se portent à la périphérie et se divisent. Lorsque ces stades ont été atteints le protoplasme de l'oogone se différencie en ooplasme et périplasme. Chez *Cystopus* et *Peronospora* cette différenciation du protoplasme s'effectue un peu plus tôt que chez *Pythium* ; elle a lieu à peu près au moment de la division nucléaire ou un peu avant et l'on rencontre une masse de périplasme dense plus abondante que chez *Pythium*. Cytologiquement *Pythium* diffère de *Cystopus* et de *Peronospora*, d'une part en raison de cette différenciation plus tardive et, d'autre part, quant à la quantité de périplasme éphémère. Par contre, ce genre paraît plus étroitement apparenté aux *Phytophthora*, *Sclerospora* et *Plasmopara* que ne l'indique MURPHY.

NOMENCLATURE DE *P. DELIENSE*

On s'est efforcé autrefois de scinder le genre *Pythium* et l'on trouve une excellente discussion de ces questions chez BUTLER (1907), FITZPATRICQ (1930) et chez MATTHEWS (1931). SCHROTER (1897) et, plus récemment, SIDERIS (1929-1932) ont plaidé en faveur de l'élévation au rang de genre du sous-genre *Nematosporangium*; mais BUTLER (1907), DRECHSLER (1930), MATTHEWS (1931) et SPARROW (1931, 1932) ne sont pas de cet avis.

En 1931, SIDERIS divise le genre *Pythium* (BUTLER, 1907) en : *Nematosporangium* où les présporanges ne sont pas des structures nettement définies et en *Pythium* où les présporanges sont nets, pythioïdes, sphériques ou ovoïdes. Mais en 1932, il écrit (p. 21) « la définition des *Pythium*, d'après laquelle seuls des organismes, possédant des présporanges pythioïdes, devraient être rangés dans le genre *Pythium*, toute parfaite qu'elle soit, est trop générale et demande quelques modifications eu égard à ces organismes dont le stade présporangial, ou mieux zoosporangial, n'a jamais été observé ». On voit ainsi que cet auteur manifeste quelques hésitations au sujet de la définition même du genre *Pythium*, telle qu'il l'a proposée.

D'autre part SPARROW (1931, 1932) voudrait scinder le genre *Pythium* (BUTLER 1907) en : *Pythium*, *Rheosporangium* et *Sphaerosporangium*. Mais il existe de nombreux rapports entre ces trois genres comme l'a indiqué MATTHEWS (1931). MEURS (1934) souligne que *Pythium myriotylum* Drechsler est un nouvel exemple de forme intermédiaire : ce Champignon étant capable de donner aussi bien des sporanges filamenteux que des sporanges lobés et si les organes que j'ai décrits chez *P. deliense* (pl. I, fig. 12) sont démontrés être bien des sporanges, cette espèce pourra être considérée comme transitoire, au même titre que *P. myriotylum*.

Aussi MEURS (1934) a-t-il eu raison de donner le nom de *Pythium deliense* à cette nouvelle espèce au lieu de celui de *Nematosporangium deliense*. A son avis cette espèce avait été auparavant considérée comme étant probablement *P. de Baryanum* (JOCHEMS, 1927) et sans doute *Phytophthora Nicotianae* Br. de Haan était-il contaminé par *P. deliense* (BREDÁ DE HAAN 1896). Il écrit à ce sujet « de nombreux chercheurs (E. G. ASBY, 1928) ont admis que BREDÁ DE HAAN n'a pas eu recours à des cultures pures ».

CONCLUSIONS

Au cours de ce travail qui comprend deux parties, je me suis proposé d'étudier d'une part les conditions de croissance des *Pythium*, d'autre part la cytologie de ces Champignons. Je me suis adressé pour cela aux espèces suivantes : *Pythium deliense* Meurs, *P. de Baryanum*, *P. mamillatum* Meurs et *P. indigoferae* Butler, mais plus spécialement toutefois au premier.

1° *P. deliense* a été cultivé sur 65 milieux, solides ou liquides, fort variés, tels que extraits de graines ou de fruits additionnés de gélose, sur des fragments de racines, de tiges, de bourgeons, de feuilles, de fruits, de plantules ou sur des Fourmis et des Scolopendres. Les trois autres Champignons ont été cultivés sur 12 à 18 milieux différents, déjà utilisés, pour la plupart, pour le précédent. Dans la nature, les trois premières espèces sont parasites sur des végétaux et la quatrième est épiphyte, mais les expériences de culture ont permis de se rendre compte que tous quatre peuvent vivre en saprophytes sur divers milieux. Tous quatre sont capables de donner des organes sexuels sur un milieu de farine de Maïs-agar et carotte. Une solution peptonée à 1% est, d'autre part, favorable à leur développement végétatif.

2° Sur milieux solides, dans tous les cas, un certain nombre d'hyphes végètent à l'intérieur du milieu, mais la plus grande partie du mycélium s'étale à la surface et est souvent aussi aérienne. Les organes sexués peuvent apparaître sur l'une ou l'autre partie.

3° La vitesse comparée de croissance a été évaluée sur agar-farine de Maïs à 20°, 25°, 30°, 35°C. A 20°C, *Pythium indigoferae* se développe le moins bien, alors que *P. de Baryanum* se développe le mieux, les deux autres présentant un développement comparable

entre eux et sensiblement intermédiaire entre celui des deux précédents. A 25°C, *P. deliense* prospère davantage que *P. mamillatum* et les quatre espèces se rangent dans l'ordre suivant, quant à leur croissance : *P. indigoferae*, *P. mamillatum*, *P. deliense* et *P. de Baryanum*. A 30°C, *P. deliense* dépasse même *P. de Baryanum*. C'est à cette température que ces Champignons offrent leur croissance maximale (sauf *deliense*).

4° Pour *P. deliense* les températures minima et optima sont respectivement 10° et 35°C, la température maximale étant aux environs de 40-45°C. Il s'agit en effet d'un Champignon d'origine tropicale. Ce Champignon ne périt pas aux températures inférieures à 10°C, il végète simplement, mais reprend aussitôt son développement dès qu'il est replacé dans des conditions favorables. Par contre, il meurt à 45°C après 24 heures.

5° Pour *P. deliense*, les nitrates ne peuvent servir de source d'azote, mais on peut employer NH_3 à cette fin. Les sulfates peuvent servir de source de S. En l'absence de source de N ou de S, la croissance est moins bonne. La peptone constitue un aliment complet pour ces Champignons et peut assurer la nutrition carbonée. On peut, en conséquence, et suivant la nomenclature de LWOFF et VOLKONSKY, considérer *P. deliense* comme *haplomésotrophe* N et *euthiotrophe*.

6° Une forte teneur du milieu en glucose ou maltose (10% ajoutés à un milieu peptoné à 1%) retarde la croissance de *P. deliense*. Le rouge neutre, ajouté à ce milieu à forte dose agit de même. Il n'y a plus de croissance dans les milieux acidifiés avec de l'acide tannique (0.5%). Par contre l'huile de foie de Morue agit favorablement sur le développement, cependant que l'extrait de malt, à doses un peu élevées, le retarde.

7° Sur agar-farine de Maïs (acidifié par une solution d'HCl), la croissance est minima à pH 2.9 ; elle augmente à mesure que l'acidité décroît jusqu'à pH 5 où elle est maximale, puis diminue jusqu'à ce que le pH atteigne la neutralité. Sur milieux alcalinisés par une solution de $\text{Na}^2 \text{CO}_3$, la croissance est maximale à pH 9 ; si l'alcalinité augmente encore elle diminue, pour cesser à pH 10.6. Il y a donc deux maxima, l'un du côté acide, l'autre du côté alcalin, celui-

ci étant plus élevé que l'autre. Entre ces deux maxima, il existe un minimum, à pH 7. *P. deliense* ne se développe pas sur le fruit de *Averrhoa corambola*, dont le pH est précisément de 2.1. Ce Champignon exige pour son développement maximum un milieu légèrement acide ou alcalin; une acidité ou alcalinité trop forte nuit à sa croissance.

8° A 30°C, sur agar-farine de Maïs, les organes sexuels de *P. deliense* apparaissent en 12-18 heures; ceux de *P. mamillatum* en 48 heures; ceux de *P. de Baryanum*, en 72 heures et, enfin, ceux de *P. indigoferae*, en 96 heures. A basse, comme à haute température, la formation de ces organes est empêchée, par exemple : à 10, 15, 38 et 40°, il n'apparaît pas d'organes sexuels chez *P. deliense*. La lumière et l'obscurité n'empêchent pas l'apparition de ces organes dans le cas des quatre Champignons étudiés. Par contre, la présence d'oxygène est indispensable.

9° Dans la plus grande partie des milieux sur lesquels *P. deliense* a été cultivé il s'est formé des organes sexuels. Sur les solutions peptonées cependant il n'en a pas été obtenu. De plus, si l'on ajoute une solution de peptone à une concentration supérieure à 0.3% à un milieu à l'agar pur, la formation des organes sexuels est ou retardée ou même arrêtée. Un extrait de malt d'Orge retarde également cette formation, tandis que l'huile de foie de Morue l'accélère. En l'absence de source de NH_3 le même phénomène est ralenti.

10° Les solutions peptonées sont hydrolysées par toutes les espèces étudiées. Mais jamais il n'est apparu d'acide oxalique lors de cette hydrolyse. Avec *P. deliense*, de *Baryanum* et *mamillatum* il se forme une assez forte quantité d'ammoniaque à partir de la peptone, et la solution devient alcaline et si le pH initial est à 5, après 21 jours à 30°C, le pH final est respectivement dans les trois cas de 8.30, 7.92 et 7.88. L'hydrolyse est moindre avec le quatrième Champignon et le pH final, même après 21 jours, est encore à 6.01, car il y a production réduite d'ammoniaque. A cet égard ce Champignon ressemble à *Penicillium glaucum*.

Ces *Pythium* ne peuvent hydrolyser le saccharose, mais ils hydrolysent l'amidon soluble. L'intensité de cette réaction est du même ordre que pour la peptone. Il y a sécrétion, par les Cham-

pignons, de diastases, mais jamais d'invertase. Celles de *P. deliense* ont été extraites.

Le degré de rapidité d'hydrolyse de l'amidon sur milieux solides a été étudié à 20, 25, 30, 35, 40 et 45°C pour les quatre espèces. Les résultats confirment ceux obtenus sur milieux liquides.

11° *P. deliense* ne forme d'ordinaire pas de sporanges en cultures. Leur développement a été provoqué et étudié en détail, de même que celui des zoospores. Les noyaux, leur système vacuolaire comme leur chondriome sont identiques à ceux du mycélium.

12° La cytologie de ces *Pythium* a été étudiée. Par une double coloration au rouge neutre et au vert Janus il a été possible de mettre en évidence à la fois le système vacuolaire et le chondriome. Grâce à la coloration vitale et *intra vitam* il a été possible d'étudier l'évolution du système vacuolaire depuis les toutes jeunes vacuoles jusqu'à la formation des canaux vacuolaires. Le contenu des vacuoles, comme les précipités intra-vacuolaires, ont été examinés. Contrairement à ce qui a été admis jusqu'ici pour les Champignons il n'y a pas de métachromatine dans les vacuoles des *Pythium*.

13° Une étude vitale du chondriome a été poursuivie de la même façon, puis aussi après fixation. On a toujours constaté que le protoplasma réduisait le vert Janus, ce qui rend, en conséquence, son étude difficile. Le chondriome est formé par des chondriocôtes et des mitochondries granuleuses. Par places, le chondriome apparaît cavulé. Le liquide de Helly a paru donner les meilleurs résultats en vue de la fixation. Contrairement à ce que l'on sait à propos des autres Champignons, les fixateurs renfermant de l'alcool, de l'acide acétique ou du formol sont capables de conserver les éléments du chondriome. Un tel fait n'était connu jusqu'ici que de *Saprolegnia*. A la température de 45-50°C le chondriome ne disparaît pas, mais il est généralement altéré (vésiculisation). Le protoplasme de nos Champignons a le pouvoir de réduire le vert Janus.

14° Après de nombreux essais avec des fixateurs très divers, il a été possible d'obtenir des images satisfaisantes du noyau. La solution de Flemming faible est ici le meilleur fixateur. Dans tous les noyaux au repos on rencontre une membrane et un nucléole central, de grande taille, fortement chromatique. Ce corps est relié

par de fins filaments à la membrane. Contre celle-ci on distingue parfois des granulations chromatiques qui se retrouvent aussi sur le réseau. La mitose est une mitose typique.

15° On a pu constater, par l'utilisation de procédés microchimiques, que la membrane de ces Champignons renfermait de la chitine et déceler dans le cytoplasme des globules graisseux.

16° Une étude du développement des organes sexuels de *P. deliense*, de leur système vacuolaire, de leur chondriome et enfin de la fécondation a été entreprise.

L'anthéridie est polynucléée ; les noyaux se divisent mitotiquement. Tous dégènèrent finalement avant la fécondation, sauf un. Il n'y a pas différenciation du protoplasme en gonoplasme et périplasma. Le chondriome de l'anthéridie, comme de l'oogone, est identique à celui du mycélium. On voit dans le jeune oogone de nombreux noyaux épars qui subissent une division mitotique. Tous gagnent la périphérie et le protoplasme se différencie en périplasma et ooplasme. L'un des noyaux périphériques gagne le centre de l'ooplasme, tandis que les autres dégènèrent dans le périplasma peu abondant. Le noyau mâle et la plus grande partie du protoplasme de l'anthéridie parviennent, à travers un tube de fécondation, jusqu'à l'ooplasme et, finalement, le noyau mâle s'unit au noyau femelle. On ne rencontre jamais de grande vacuole centrale à l'intérieur de l'oogone. Une membrane épaisse apparaît progressivement autour de l'oospore ; elle est faite probablement de chitine.

Après la prophase, la membrane nucléaire se dissout et disparaît. Il n'existe ni centrosome, ni « coenocentre » organisé chez le *P. deliense*.

Les particules nutritives du jeune oogone sont représentées par des granulations lipidiques. A peu près à l'époque de la fécondation, on note la présence de glycogène à l'état diffus dans le protoplasma. On constate l'existence d'un corps de réserve dans l'oospore à maturité, mais il n'a pas été possible de préciser sa nature chimique.

17° La méthode de Kolatchev a été suivie dans ses plus minutieux détails et appliquée à l'étude du mycélium des quatre espèces de *Pythium* et à celle des organes sexuels de *P. deliense* en vue de mettre en évidence les plaquettes osmiophiles décrites par BOWEN,

et qui sont, d'après lui, les homologues de l'appareil de Golgi des cellules animales. A l'intérieur des vacuoles incolores on a rencontré des corps se colorant intensément en noir, de forme et de taille variables, qui ne sont autre chose que les corpuscules intra-vacuolaires précipités. Les corps rencontrés dans le cytoplasma sont simplement des éléments du chondriome ayant subi des altérations par suite de l'imprégnation osmique. Il n'existe aucune formation, en dehors du chondriome et du système vacuolaire, qui puisse être rapportée à l'appareil de Golgi.

18° *P. deliense* enfin a été comparé en se basant sur l'oogénèse à *P. aphanidermatum*, *P. torulosum*, *P. de Baryanum* et *P. ultimum*. et de cette comparaison il résulte que l'on peut classer ces espèces dans l'ordre d'évolution ascendante suivante : *P. aphanidermatum*, *P. deliense*, *P. torulosum*, *P. de Baryanum* et *P. ultimum*.

EXPLICATIONS DES PLANCHES

A = Anthéridie ; B = Bourgeon ; C = Cil ; Cc = Chondrioconte ; Cg = Mitochondries gonflées ; Cm = mitochondrie granuleuse ; Cp = « central-plasm » ; Cr = Corps réfringent ; Cyt = Cytoplasme ; Ex = Exospore ; En = Endospore ; Ft = Tube de fécondation ; Grg. = granulation lipidique ; Ic = Corpuscule intravacuolaire ; K = protubérance ; M = Membrane ; Mo = Membrane de l'oospore (Parois) ; N = Noyau ; Nc = Nucléole ; Nf = Noyau fécondé ; Nm = Membrane nucléaire ; O = Oogone ; Oo = Ooplasme ; Os = Oospore ; Osp = Oosphère ; P = Périplasme ; Rg = Globule de réserve ; S = Sporange ; T = Tube de décharge ; V = Vacuole ; Vc = Canal vacuolaire ; Ves = Vésicule ; Vs = Vésicule mitochondriale ; Z = Zoospore.

Au clichage les figures des planches I à VI ont toutes été réduites de 1/4 environ.

PLANCHE I

Pythium deliense

- Fig. 1. — Sporange terminal avec contenu granuleux. *In vivo* ($\times 500$).
- Fig. 2. — Sporange terminal montrant le tube de décharge filamenteux se terminant en une vésicule dans laquelle le protoplasme s'est accumulé. *In vivo* ($\times 500$).
- Fig. 3. — La vésicule vue un peu plus tard ($\times 800$). Le protoplasme s'est détaché de la membrane et a pris une forme sphérique.
- Fig. 4. — Vésicule dans laquelle les zoospores ont été formées. Chaque zoospore porte 2 cils. *In vivo* ($\times 800$).
- Fig. 5. — Vésicule un peu plus grosse. Chaque zoospore est animée de mouvements de nage rapides. *In vivo*.
- Fig. 6. — Zoospores réniformes. *In vivo*.
- Fig. 7. — Sporange, coloré vitalement par le rouge neutre, montrant son système vacuolaire ($\times 700$). *In vivo*.
- Fig. 8. — Sporange fixé suivant la méthode de Helly et coloré par l'hématoxyline ferrique, montrant son système vacuolaire, les noyaux, les chondriocontes, les mitochondries granuleuses et le cytoplasme.
- Fig. 9 et 10. — Formations ressemblant à des sporanges intercalaires qui n'ont pas germé ; fixées dans la solution de Flemming faible et colorées par l'hématoxyline ferrique.
- Fig. 11 et 12. — Formations lobulaires terminales ressemblant à des sporanges ; *In vivo* ($\times 700$).

Fig. 13. — Sporange terminal *in vivo* donnant naissance à un tube de décharge qui a cessé de croître.

Fig. 14. — *a, b, c*, Tubes terminaux analogues à des tubes de décharge s'étant développés anormalement, vus à des stades différents; ils ne forment pas de vésicules. *In vivo*.

PLANCHE II

Pythium deliense

Fig. 1. — ($\times 2000$); fig. 18 (1/2 grandeur nature); Fig. 19 ($\times 120$). Les autres figures sont grossies environ 3.000 fois. Les granulations lipidiques et les chondriosomes ne sont pas représentés dans les figures 3 à 12, 15 et 16.

Fig. 1. — Filament montrant des vacuoles, des granulations lipidiques et le cytoplasme (sans coloration). Le chondriome n'est pas visible.

Fig. 2. — Filament coloré vitalement avec du vert Janus. Le chondriome est visible.

Fig. 3. — Filament vivant montrant de petites vacuoles qui fusionnent pour en donner de plus grandes. Coloration vitale au rouge neutre.

Fig. 4. — Syst. vacuol. *in vivo* sous forme de réseau et de canalicules.

Fig. 5, 6, 7 et 11. — Filaments colorés vitalement avec le rouge neutre montrant les différents aspects des corpuscules intravacuolaires. Sur la fig. 11 on voit un corpuscule intravacuolaire qui a été expulsé dans le cytoplasme, ce qui a rarement lieu.

Fig. 8, 9 et 10. — Filaments colorés vitalement par une solution légèrement concentrée de rouge neutre. Le contenu vacuolaire est d'abord précipité sous forme de corpuscules de formes variées et les vacuoles restent pendant quelque temps non colorées. Dans la fig. 2 le colorant diffuse de la périphérie vers l'intérieur de la vacuole.

Fig. 12, 15 et 16. — Filaments ayant poussé sur des milieux additionnés de rouge neutre. Sur la fig. 12 la teinte du rouge neutre dans le canal vacuolaire est devenue faible. Sur les figures 15 et 16 les vacuoles sont incolores et contiennent des corpuscules intravacuolaires colorés.

Fig. 13 et 14. — Filaments ayant poussé sur des milieux additionnés de rouge neutre et colorés ensuite vitalement avec du vert Janus.

Fig. 17. — Filament vivant traité par le violet Dahlia. Les chondriosomes sont tous vésiculés.

Fig. 18. — Culture du mycélium à la surface de la peptone liquide en forme de disque feutré épais et gélatineux.

Fig. 19. — Excroissances de mycélium en forme de bourgeons produites dans les cultures sur gélose à 2 % d'extrait de malt.

Fig. 20. — Filaments (traités par la méthode de Kolatchev, 8 jours) montrant la vésiculation des éléments du chondriome et aussi de petits chondriotes normaux.

PLANCHE III

Préparations colorées à l'hématoxyline ferrique

Pythium deliense

- Fig. 1 à 4. — Filaments montrant les éléments du chondriome ; les vacuoles et les noyaux. Fig. 1 : filament fixé par le liquide de Helly ($\times 1.800$). Fig. 2 : *idem* ($\times 3.000$). Fig. 3 : filament fixé par le liquide de Regaud ($\times 2.300$). Fig. 4 : filament obtenu sur Pomme de terre, fixé par le liquide de Regaud-Tupa ($\times 2.000$).
- Fig. 5. — Filament fixé dans le liquide de Helly. On voit la plupart des mitochondries granuleuses et quelques-unes en bâtonnets ($\times 2.000$).
- Fig. 6. — Filament fixé dans le liquide de Helly montrant les éléments du chondriome ($\times 2.000$).
- Fig. 7. — Filament cultivé à 45°-50°C pendant 1/2 heure environ puis fixé au sublimé-formol. On voit les mitochondries à des stades variés de vésiculation. Toutes ne sont pas altérées ($\times 2.000$).
- Fig. 8. — Filament fixé au liquide de Helly. Les vacuoles sont visibles ($\times 2.000$).
- Fig. 9. — Noyau au repos montrant un gros nucléole, des trabécules de linine et des granules de chromatine ($\times 4.800$).
- Fig. 10. — Filament fixé dans la solution de Flemming faible. On voit les noyaux à différents stades de division. *t* = télophase ; *p* = stade de spirème (prophase) ; *m* = métaphase ($\times 2.000$).

Pythium de Baryanum.

- Fig. 11 et 12. — Filaments fixés au liquide de Helly montrant les éléments du chondriome, les vacuoles et les noyaux. Fig. 11 ($\times 2.300$). Fig. 12 ($\times 2.000$).
- Fig. 13. — Filament sans coloration, montrant les vacuoles et les granulations lipidiques ($\times 2.000$).
- Fig. 14. — Filament poussé sur milieu additionné de rouge neutre. La coloration du canal vacuolaire est devenue faible ($\times 2.000$).

Pythium mamillatum

- Fig. 15. — Filament fixé dans la solution de Flemming faible. Le cytoplasme n'est pas continu ($\times 1.200$).
- Fig. 16. — Filament fixé dans le liquide de Helly montrant les éléments du chondriome et les noyaux. *m* = métaphase ; *t* = télophase ($\times 2.800$).

Pythium indigoferae

- Fig. 17 à 19. — Filaments montrant les éléments du chondriome, les noyaux et les vacuoles. Fig. 17 : filament fixé par le liquide de Regaud ($\times 2.000$). Fig. 18 et 19 : Filaments fixés par le liquide de Helly ($\times 2.800$).
- Fig. 20. — Filament coloré vitalement par le rouge neutre. De petites vacuoles fusionnent pour en donner de plus grandes ($\times 2.800$).

Fig. 21. — Filament poussé sur milieu additionné de rouge neutre. La coloration du canal vacuolaire est devenue faible, des précipités en forme de croissants, d'*x*, etc., sont visibles ($\times 2.800$).

PLANCHE IV

Pythium deliense.

Pour la clarté des figures, les granulations lipidiques n'ont généralement pas été dessinées.

Fig. 1. — Oogone et anthéridie portés par le même filament ($\times 1.200$).

Fig. 2. — Oogone avec une oospore et une anthéridie intercalaire, position la plus fréquente chez ce Champignon ($\times 1.000$).

Fig. 3. — Oogone avec une anthéridie. Ooplasme à bords légèrement irréguliers ($\times 1.200$).

Fig. 4. — Jeune oogone coloré par le rouge neutre. Vacuoles fortement colorées. ($\times 1.450$).

Fig. 5. — Oogone un peu plus âgé coloré par le rouge neutre. Le contenu de l'oogone s'est différencié en périplasma et ooplasme. Il y a de petites vacuoles dans le périplasma et de grandes dans l'ooplasme ($\times 1.450$).

Fig. 6. — Oogone avec spore à demi mûre, traité par le rouge neutre. Deux grandes vacuoles contenant des corpuscules intravacuolaires sont visibles ($\times 1.450$).

Fig. 7. — Jeune oogone montrant l'ooplasme légèrement irrégulier et le périplasma. Il y a beaucoup de granulations lipidiques dans l'ooplasme.

Fig. 8. — Oogone, avec une oospore, coloré par le rouge neutre. A ce stade une seule grande vacuole est visible ($\times 1.450$).

Fig. 9. — Section d'une jeune anthéridie traitée par la méthode de Kolatchev et colorée par l'érythrosine. Les précipités vacuolaires ayant réduit l'acide osmique sont colorés en noir à l'intérieur des vacuoles incolores ($\times 1.500$).

Fig. 10. — Section d'un oogone et d'un hyphe traités par la méthode de Kolatchev et colorés par l'érythrosine. Les précipités vacuolaires ayant réduit l'acide osmique sont colorés en noir à l'intérieur des vacuoles incolores. Centralplasma coloré un peu plus intensément ($\times 1.800$).

Fig. 11. — Section d'un oogone, avec une oospore, traité par la méthode de Kolatchev ($\times 1.800$).

Fig. 12. — Jeune anthéridie et jeune oogone *in vivo* colorés par le vert Janus qui a mis en évidence les éléments du chondriome. (Quelques granulations lipidiques ont été dessinées ici.) ($\times 1.200$).

Fig. 13. — *Idem*. Coupe. Fixation dans le liquide de Helly, coloration par l'hématoxyline ferrique, montrant les éléments du chondriome ($\times 1.200$).

Fig. 14. — Section d'un oogone, avec oosphère, fixé dans le liquide de Helly et coloré par l'hématoxyline ferrique montrant les éléments du chondriome, les vacuoles, le noyau ♂ et le noyau ♀.

Pythium mamillatum.

Fig. 15. — Un hyphe de *P. mamillatum* traité par la méthode de Kolatchev (en coupe) montrant les précipités vacuolaires à l'intérieur du canal vacuolaire anastomosé.

PLANCHE V

Pythium deliense.

Matériel fixé dans la solution de Flemming fort. Pour la clarté des figures, les éléments du chondriome n'ont généralement pas été dessinés. Grossissement des figures de cette planche $\times 1.800$. Les fig. 3 à 12 représentent des coupes.

- Fig. 1. — Filaments destinés à former un oogone terminal et une anthéridie terminale, non coupés. On voit beaucoup de petits noyaux.
- Fig. 2. — Jeune oogone et jeune anthéridie intercalaire, non coupés. L'oogone et l'anthéridie sont multinucléés. Les noyaux de l'oogone sont plus gros.
- Fig. 3. — Jeune oogone montrant beaucoup de noyaux et quelques petites vacuoles.
- Fig. 4. — Jeune oogone et anthéridie. Dans l'oogone, noyaux en métaphase et, dans l'anthéridie, noyaux au début de la prophase. Les éléments du chondriome ont été dessinés ici.
- Fig. 5. — A l'intérieur de l'oogone se trouvent beaucoup de vacuoles et les noyaux se dirigent vers la périphérie après leur division.
- Fig. 6. — Le contenu de l'oogone s'est différencié en périplasme et ooplasme. Beaucoup de noyaux se trouvent à la périphérie, mais paraissent entrer en dégénérescence. On voit un gros noyau se dirigeant vers l'ooplasme au centre duquel on distingue le centralplasme. Il y a de grandes vacuoles à la partie périphérique de l'ooplasme. Les éléments du chondriome ont été dessinés.
- Fig. 7. — Comme ci-dessus, mais le noyau femelle se trouve à mi-chemin vers le centralplasme. Dans l'anthéridie on voit un noyau mâle et deux noyaux en dégénérescence.
- Fig. 8. — Le centralplasme est légèrement plus coloré que le reste de l'ooplasme.
- Fig. 9. — Centralplasme dans lequel on voit le noyau femelle en contact avec une tache noire (due à une mauvaise différenciation).
- Fig. 10. — Anthéridie montrant un noyau en métaphase.
- Fig. 11. — A l'intérieur de l'oogone, un noyau mâle fusionnant avec le noyau femelle. Le périplasme et le noyau périphérique sont presque complètement dégénérés. A l'intérieur de l'anthéridie, très peu de protoplasme.
- Fig. 12. — Une oospore mûre, avec une membrane épaisse à l'intérieur de l'oogone. On voit le noyau fécondé et un globule de réserve.
- Fig. 13. — Noyaux (prophase) à l'intérieur de l'oogone.

PLANCHE VI

Pythium deliense

Grossissement $\times 1.500$.

- Fig. 1. — A l'intérieur d'un oogone (*in vivo*), une jeune oospore renfermant de grosses granulations lipidiques et une anthéridie avec le tube de fécondation. L'anthéridie est vide, mais on y voit cependant (*in vivo*) quelques granulations lipidiques et un peu de protoplasme.
- Fig. 2. — Oospore presque mûre avec une membrane épaisse à l'intérieur de l'oogone, après traitement par la solution iodo-iodurée, montrant le pro-

toplasme coloré en acajou, mais d'une manière plus ou moins intense selon les endroits (non coupé).

Fig. 3. — Oospore mûre vivante avec un globule de réserve et un corps réfringent.

Fig. 4. — Oospore mûre traitée par l'acide osmique. Le globule de réserve a ici une cavité intérieure.

Fig. 5. — Le globule de réserve présente 3 cavités intérieures.

Fig. 6. — Section d'oogone. Le noyau femelle est visible dans le centralplasme et le noyau mâle dans le tube de fécondation.

Fig. 7. — *Idem*. Ici le noyau mâle est libre à côté du noyau femelle.

Fig. 8. — Oospore à moitié mûre avec une grosse vacuole. La membrane n'est pas très épaisse (coupe).

Fig. 9. — Photographie d'une boîte de Petri avec milieu de culture montrant la partie hydrolysée par *P. deliense* (culture de 24 h. à 40°C). L'espace complètement hydrolysé apparaît en blanc.

Fig. 10. — *Idem*. Culture de 48 h. à 40°C.

PLANCHE VII

Photographies de boîtes de Petri contenant le milieu de culture montrant comparativement les parties hydrolysées par divers Champignons au bout de 48 h. à différentes températures. L'espace complètement hydrolysé apparaît en blanc. Le matériel a été traité par la solution iodo-iodurée avant la photographie.

Ind. = *Pythium indigoferæ*.

Mam. = *Pythium mamillatum*.

Deb. = *Pythium de Baryanum*.

Del. = *Pythium deliense*.

A 35° les photos de *Ind.* *Man.* et *Deb.* sont du même type parce qu'il n'y a pratiquement aucune croissance de ces Champignons à cette température.

BIBLIOGRAPHIE

- ASHBY (S. F.). — 1928. The oospores of *Phytophthora Nicotianae* Br. de Haan with notes on the taxonomy of *P. parasitica* Dastur. *Trans. brit. myc. Soc.*, T. 8 : pp. 86-95.
- BACH (D.). — 1925. Contribution à l'étude de la nutrition azotée de l'*Aspergillus repens* de Bary. *Thèse, Fac. des Sciences, Paris*, 1925 (St-Dizier, André Brulliard).
- BERLESE (A.-N.). — 1897. Ueber die Befruchtung und Entwicklung der Oospaere bei den Peronosporeen. *Jahrb. f. wiss. Bot.*, T. 31, pp. 159-196.
- BOSE (S.-K.). — 1931. The question of Golgi bodies in the higher fungi. *Ann. Bot.*, T. 45, p. 303.
- BOWEN (R.-H.). — 1926. Preliminary notes on the structure of plant protoplasm. *Science*, 63 : pp. 620-621.
- BOWEN (R.-H.). — 1927. A preliminary report on the structural elements of the cytoplasm in plant cells. *Biol. Bull.*, 53, pp. 119-196.
- BOWEN (R.-H.). — 1928. Studies on the structure of plant protoplasm. I. The osmiophilic platelets. *Zeitschr. f. Zellforschung und mikr. Anat.* T. 6.
- BOWEN (R.-H.). — 1929. II. Plastidome and pseudo-chondriome. *Ibid.*, T. 7.
- BOWEN (R.-H.). — 1929-30. The use of osmic impregnation methods in plant cytology. *Bull. of Torrey bot. Club*, T. 56.
- BOYLE (C.). — 1924. The growth reactions of certain fungi to their staling products. *Ann. of Bot.*, T. 38 ; p. 113.
- BRAÛN (H.). — 1925. Comparative studies of *Pythium de Baryanum* and two related species from *Geranium*. *Jour. Agr. Res. Washington*, T. 30 : pp. 1.043-1.062.
- BREDA DE HAAN (J. van). — 1896. De bibitziekte in Deli tabak, veroorzaakt door *Phytophthora Nicotianae*. *Med's Londs Plantentuin*, Nr. 15, p. 107.
- BRIGHTMAN (C.), MEACHAM (M.) and ACREE (S.). — 1920. A spectrophotometric study of the « salt effects » of phosphate upon the color of phenol-sulfone-phthaleine salts and some biological applications. *Journ. Bacter.*, T. 5 ; p. 169.
- BUTKEWITSCH (W.). — 1903. Umwandlung der Eiweiss-stoffe durch die niederen Pilze im Zusammenhang mit einigen Bedingungen ihrer Entwicklung. *Jahrb. f. wiss. Botanik*, T. 38, p. 147.

- BUTLER (E. J.). — 1907. An account of the genus *Pythium* and some *Chytridiaceæ*. *Memoirs of the Dept. of Agr. in India*, T. 1, pp. 1-160.
- CARLSON (M. C.). — 1929. Gametogenesis and fertilization in *Achlya racemosa*. *Ann. of Bot.*, T. 43, pp. 111-117.
- CHAZE (J.). — 1925. Essais de culture pure d'une Saprolegniacée, (Diplôme d'Etudes supérieures). *Ed. L. Declume*, Lons-le-Saulnier.
- CLARK (M.) et LUBS (M.). — 1917. The calorimetric determination of hydrogen ion concentration and its application in Bacteriology. *Journ. Bact.* 2.
- CLAUSSEN (P.). — 1908. Ueber Entwicklung und Befruchtung bei *Saprolegnia monoica*. *Festschr. deutsch. bot. Ges.*, T. 26, p. 144.
- COOPER (G. O.). — 1929. A cytological study of fertilization in *Achlya hypogina* Coker and Pemberton, and cytological studies on the sporangium development and gametogenesis in *Brevilegnia diclina* Harvey. *Trans. Wisconsin. Acad. Sc.*, T. 24, pp. 303-322.
- COUCH (J. N.). — 1926. Notes on the genus *Aphanomyces*, with a description of a new semiparasitic species. *Jour. Elisha Mitchell Sci. Soc.*, T. 41, pp. 213-227.
- COUCH (J.-N.). — 1932. The development of the sexual organs in *Leptolegnia caudata*. *American Jour. Bot.*, T. 19, pp. 584-599.
- DANGEARD (P. A.). — 1894. Recherches sur la reproduction sexuelle des Champignons. *Le Botaniste*, p. 221.
- DANGEARD (P. A.). — 1931. *Pythium muscæ*. *Le Botaniste*, 22^e série, p. 452.
- DAVIS (B. M.). — 1900. The fertilization of *Albugo candida*. *Bot. Gaz.* T. 29, p. 297.
- DAVIS (B. M.). — 1903. Oogenesis in *Saprolegnia*. *Bot. Gaz.*, T. 35, pp. 233-249 et 320-349.
- DAVIS (B. M.). — 1905. Fertilization in the Saprolegniales. *Bot. Gaz.*, T. 39.
- DAVIS (R. G.). — 1926. *J. Agric. Res.*, T. 31, pp. 801-825.
- DE BARY (A.). — 1881. Untersuchungen über die Peronosporéen und Saprolegnieen und die Grundlagen eines natürlichen Systems der Pilze. Beiträge zur Morphologie und Physiologie der Pilze. IV.
- DE BARY (A.). — 1887. Comparative morphology and biology of the fungi, mycetoza and Bacteria. English Ed. Oxford.
- DENNIS (R. W. G.). — 1933. *The West of Scotland agricul. Coll. Bull.* 3.
- DRECHSLER (Ch.). — 1930. Some new species of *Pythium*. *Jour. wash. Acad. Sc.*, T. 20, pp. 398-418.
- DOSDALL (L.). — 1923. *Minn. Agric. Expt. Sta. Tech. Bull.* 17.
- DUBOSQ (O.) et GRASSÉ (P.). — 1933. L'appareil parapasal des Flagellés avec remarques sur le trophosponge, l'appareil de Golgi et le vacuome. *Arch. Zool. exp. et gén., Protist.*, T. 37, 1933.
- EDSON (H. A.). — 1915. *Rheosporangium aphinodermatum*. A new

- genus and species of fungus parasitic on sugar beets and radishes. *Jour. Agr. Res.*, Washington. T. 4, pp. 279-293.
- EICHHORN (A.). — 1933. La mitose somatique du cotonnier. *C. R. Soc. Biol.*, T. XCII, p. 260.
- EICHHORN (A.). — 1933 a. *C. R. Soc. Biol.*, T. 112, p. 535.
- EICHHORN (A.). — 1934 a. Le noyau et sa division chez le Lupin. *C. R. Soc. Biol.* T. CXV; p. 1.064.
- EICHHORN (A.) et FRANQUET (R.). — 1934. Sur le noyau de *Musa Ensete* et sa division. *C. R. Soc. Biol.*, T. CXVII, p. 653.
- EICHHORN (A.) et FRANQUET (R.). — 1934 b. A propos du polymorphisme nucléaire. *C. R. Soc. Biol.*, T. CXVII, p. 983.
- EZEKIEL (V.). — 1923. Hydrogen ion concentration and development of *Sclerotinia Apothecia*. *Science* (166), 31 août.
- FISCH (C.). — 1885. Ueber das Verhalten der Zellkerne in fusionierenden Pilzzellen. *Bot. Cent.*, T. 24, p. 221.
- FITZPATRICK (H. M.). — 1930. The lower fungi. *Phycomycetes*.
- FORENBACHER (A.). 1911. Die Chondriosomen und Chromatophorenbildung. *Ber. d. deut. bot. Gesell.*, T. 29, pp. 648-660.
- FRIEDRICHS (Gr.). — 1922. Entstehung der Chromatophoren bei *Elodea canadensis*. *Jahrb. f. wiss. Bot.* 61; pp. 430-450.
- GAUTHIERET (R. J.). — 1935. Recherches sur la culture des tissus végétaux : Essais de culture de quelques tissus méristématiques. *Thèse, Fac. des Sciences*, Paris (Rennes, Imprimerie Oberthur).
- GAVAUDAN (P.). — 1933. Sur une certaine corrélation entre la réversibilité des phénomènes d'instabilité cytoplasmique et la disparition spontanée des colorations vitales du vacuome dans l'*Ascoidea rubescens*. *C. R. Ac. Sc.*, 196, p. 563.
- GAYNEY. — 1918. Soil reaction and the growth of *Azotobacter*. *Jour. Agri. Res.* Washington. T. 15, p. 265.
- GHIMPU (V.). — 1930. Recherches cytologiques sur les genres *Hordeum*, *Acacia*, *Medicago*, *Vitis* et *Quercus*. *Thèse, Fac. des Sciences*, Paris.
- GOLGI (C.). — 1898. *Arch. ital. de Biol.*, 30, pp. 60-71 et 273-286.
- GUEGEN (E.). — 1898-1899. Recherches sur les organismes mycéliens des solutions pharmaceutiques. *Bull. Soc. Myc. France*, T. 14 : pp. 201-252 et T. 15, pp. 15-36.
- GUILLIERMOND (A.). — 1903. Recherches cytologiques sur les Levures. V. Corpuscules métachromatiques. *Rev. gén. Bot.* T. 15, p. 166.
- GUILLIERMOND (A.). — 1913. Les progrès de la cytologie des Champignons. *Progress. Rei Botanicae*, pp. 389-549.
- GUILLIERMOND (A.). — 1920 a. Sur la métachromatine des Champignons. *C. R. Soc. Biol.*, 83, p. 202.
- GUILLIERMOND (A.). — 1920 b. Observations cytologiques sur le cytoplasme d'un *Saprolegnia*. *La Cellule*, T. 30, pp. 357-378.
- GUILLIERMOND (A.). — 1929 a. Sur le développement d'un *Saprole-*

gnia en milieu additionné de colorants vitaux et coloration vitale de son vacuome, pendant son développement. *C. R. Ac. Sc.*, 188. p. 1.621.

- GUILLIERMOND (A.). — 1930 a. Le vacuome des cellules végétales. *Protoplasma*, 9, p. 133.
- GUILLIERMOND (A.). — 1930 b. Culture d'un *Saprolegnia* en milieu additionné de colorants vitaux. Valeur de la coloration vitale. *Bull. Hist. appl. à la Physiol.*, T. 4, p. 66.
- GUILLIERMOND (A.). — 1930 c. Sur la toxicité des colorants vitaux. *C. R. Soc. Biol.*, T. 104, p. 468.
- GUILLIERMOND (A.). — 1934 (a). Le chondriome. Actualités scientifiques et industrielles. Hermann, Paris.
- GUILLIERMOND (A.). — 1934 (b). Le système vacuolaire ou vacuome. Hermann, Paris.
- GUILLIERMOND (A.). — 1935. Nouvelles recherches sur la nature et la signification des formations dites de Golgi. *Rev. de Cytol. et de Cytophysiol. végétales*. T. I, pp. 197-249.
- GUILLIERMOND (A.). MANGENOT (G.) et PLANTEFOL (L.). — 1933. Traité de cytologie végétale. Librairie E. Le François, Paris.
- GUILLIERMOND (A.) et OBATON (F.). — 1934. Sur l'action du pH du milieu dans la coloration vitale des cellules végétales. *C. R. Soc. Biol.*, T. CXVI, p. 984.
- GWYNNE-VAUGHAN (H. C. I.) et BARNES (B.). — 1927. The structure and development of the fungi.
- HOPKINS (E.). — 1922. Hydrogen ion concentration in its relation with wheat scab. *Amer. Jour. Bot.* T. 9, p. 159.
- JOCHEMS (S. C. J.). — 1927. Parasitic Stengel-Verbranding bij Deli-Tabak, *Med. Deli Praefstation te Medan-Sumatra*, Ser. 2, n° 49, p. 35.
- JORDAN (E. O.). — 1920. A Text-book of general Bacteriology.
- KARRER (J.). — 1921. Studies in the physiology of fungi. XIII. The effect of hydrogen ion concentration upon the accumulation and activation of amylase produced by certain fungi. *Ann. Miss. Bot. Gard.* T. 8, p. 63.
- KIRBY (R.). — 1922. *Phytopath.*, T. 12, pp. 66-65.
- KIRBY (R. S.). — 1925. *Cornel. agric. Expt. Sta.*, Mem. 88.
- KING (C. A.). — 1904. Observations in the cytology of *Avaospora pulchra*. *Proc. Boston Soc. Nat. Hist.*, T. 31, pp. 211-245.
- KLOTZ (J.). — 1923. Some aspects of nitrogenous metabolism in fungi. *Ann. Miss. Bot. Gard.*, T. 10, p. 1.
- KRÜGER (F.). — 1910. Beitrag zur Kenntnis der Kernverhältnisse von *Albugo candida* und *Peronospora Ficariae*. *Cent. f. Bakter.*, T. 27, pp. 186-205.
- LEACH (J. G.). — 1923. *Minn. Agric. Expt. Sta. Tech. Bull.* 14.
- LEWITSKY (G.). — 1910. Ueber die Chondriosomen in pflanzlichen Zellen. *Ber. deut. bot. Gesell.*, T. 28. pp. 538-548.

- LINDFORS (T.). — 1924. Einige Kulturversuche mit *Fusarium* Arten, in Nährlösungen von verschiedenen Wasserstoffionenkonzentration. *Bot. Notizer*, p. 161.
- LINOSSIER (G.) et ROUX (G.). — 1890. Sur la nutrition du Champignon du muguet. *C. R. Ac. Sc.*, 110, p. 335.
- LWOFF (A.). — 1932. Recherches biochimiques sur la nutrition des Protozoaires. Le pouvoir de synthèse. *Thèse Fac. des Sciences*. Paris.
- MATTHEWS (V. D.). — 1931. Studies in the Genus *Pythium*. Chapel Hill. The University of North Carolina Press, p. 136.
- MCKINNEY (H. H.). — 1925. *U. S. Dept. Agric. Bull.* 1347.
- MEURS (A.). — 1934. Parasitic stemburn of deli tobacco. *Phytopathologische Zeitschrift*. T. 7, Heft 2, pp. 169-185.
- M'GREGOR-ROBERTSON (J.). — The household Physician. T. II.
- MITRA (M.) and MEHTA (P.-R.). — 1934. The effect of hydrogen ion concentration on the growth of *Helminthosporium nodulosum* B. et C. and *H. leucostylum* Drech. *The Indian Journ. Agr. Sc.*, T. 4, p. 5, et 914.
- MIYAKE (K.). — 1901. The fertilization of *Pythium de Baryanum*. *Ann. of Bot.*, T. 15. pp. 653-667.
- MOREAU (F.). — 1914. Le chondriome et la division des mitochondries chez les *Vaucheria*. *Bull. Soc. Bot. France*, T. 61, pp. 139-142.
- MOTTIER (D. M.). — 1918. Chondriosomes and the primordia of chloroplasts and leucoplasts. *Ann. of Bot.*, T. 32, pp. 91-144.
- MOTTIER (D.-M.). — 1921. On certain plastids, with special reference to the protein bodies of *Zea*, *Ricinus* and *Conopholis*. *Ann of Bot.*, T. 35, pp. 349-364.
- MURPHY (P. A.). — 1918. The morphology and cytology of the sexual organs of *Phytophthora erythroseptica* Pethy. *Ann. of Bot.*, t. 32, pp. 115-153.
- NÄSSLUNG (C.) und DERNBY (K.). — 1923. Untersuchungen über einige physiologische Eigenschaften der Strahlenpilze. *Bioch. Zeits.* 138, p. 497.
- NASSONOW (D.). — 1918. Recherches cytologiques sur les cellules végétales. *Arch. russes d'Anat., Hist. et Embryologie*. 2, pp. 95-127.
- PARAT (M.). — 1928. Contribution à l'étude morphologique et physiologique du cytoplasme. *Arch. Anat. micr.* T. 24.
- PATTERN (R.), SCOTT (M.) et GATENBY (J. B.). — 1928. The cytoplasmic inclusions of certain plant cells. *Quart. Journ. Mic. Sc.*, T. LXXII; pp. 387-401.
- PATTERSON (P.). — 1927. Oögenesis in *Pythium torulosum*. *Journ. Elisha Mitchell. Sc. Soc.*, T. 43, pp. 124-128.
- PELTIER (G.). — 1912. A consideration of the physiology and life history of a parasitic *Eotrytis* on pepper and lettuce. *Rep. Miss. Bot. Gard.*, T. 23, p. 74.

- PELTIER (G.). — 1921. The influence of temperature and humidity on the growth of *Pseudomonas citri* and its host plants and an infection and development of the disease. *Jour. Agr. Res. Washington*. T. 20; pp. 447-506.
- PETRI (L.). — 1913. Studi sulla malattia del Castagni, detta « dele inchiostro » *Ann. del R. Inst. sup. forest. naz.*, T. 3.
- POLICARD (A.) et MANGENOT (G.). — 1922. Action de la température sur le chondriome cellulaire. *C. R. Ac. Sc.*, 174, pp. 645.
- RUHLAND (W.). — 1904. Studien über die Befruchtung von *Albugo Lepigoni* und einiger Peronosporeen. *Jahrb. f. wiss. Bot.*, T. 39. pp. 135-166.
- SAKSENA (R. K.). — 1932. Observation sur le chondriome de *Pythium de Baryanum*. Hesse. *C. R. Soc. Biol.*, T. CXI; p. 751.
- SCHROETER (J.). — 1897. *Saprolegniae* in « Engler-Prantl » *Natürliche Pflanzenfamilien I. Abt. I*. p. 104.
- SIDERIS (C. P.). — 1929. Taxonomic studies in the family *Pythiaceæ*. *Phytopathology*. T. 19, pp. 1.142-1.143 (abstract).
- SIDERIS (C. P.). — 1930. The proper taxonomic classification of certain pythiaceous organisms. *Science*, N. S., T. 71; pp. 323-324. (Abstract in *Rev. appl. myc.* T. 9, p. 561).
- SIDERIS (C. P.). — 1931. Taxonomic studies in the family *Pythiaceæ*. I. *Nematosporangium*. *Mycologia*. T. 23; pp. 252-295.
- SIDERIS (C. P.). — 1931 a. The classification of *Pythium*. *Science*, N. S., t. 74; pp. 596-597 (abstract in *Rev. appl. myc.*, T. 11; p. 330).
- SIDERIS (C. P.). — 1932. Taxonomic studies in the family *Pythiaceæ*. II. *Pythium*. *Mycologia*. T. 34.
- SINGH (U. B.). — 1923. *Ind. Jour. Agr. Sc.*, 3, pp. 496-529.
- SMITH (F. E. W.). — 1923. On direct nuclear division in the vegetation mycelium of *Saprolegnia*. *Ann. of Bot.*, T. 37., pp. 63-73.
- SPARROW (F. K.). — 1931. The classification of *Pythium*. *Science*, N. S. T. 73, pp. 41-42 (abstract in *Rev. Appl. myc.*, T. 10, p. 342).
- SPARROW (F. K.). — 1932. The classification of *Pythium*. *Mycologia*. T. 24, pp. 349-351.
- STEVENS (F. L.). — 1899. The compound oospore of *Albugo Bliti*. *Bot. Gaz.*, T. 28, p. 149.
- STEVENS (F. L.). — 1901. Die Gametogenese und Befruchtung bei *Albugo*. *Ber. deut. bot. Gesel.*, T. 19, p. 171.
- STEVENS (F. L.). — 1901. Gametogenesis and Fertilization in *Albugo*. *Bot. Gaz.*, T. 32, p. 77.
- TROW (A. H.). — 1899. Observation on the biology and cytology of a new variety of *Achlya americana*. *Ann. of Bot.*, T. 13, p. 131.
- TROW (A. H.). — 1901. Observations of the biology and cytology of *Pythium ultimum*. *Ann. of Bot.*, T. 15, p. 269.
- TROW (A. H.). — 1904. On fertilization in the *Saprolegnieae*. *Ann. of Bot.*, T. 18, pp. 541-569.

- VOLKONSKY (M.). — Sur les conditions de culture et le pouvoir de synthèse de *Saprolegnia* sp. (Étude qualitative de l'alimentation carbonée, azotée et sulfurée). 2^e Thèse. Fac. des Sciences. Paris.
- VOLKONSKY (M.). — 1933 a. — Sur l'assimilation des sulfates par les Champignons : euthiotrophie et parathiotrophie. C. R. Ac. Sc. 197, pp. 712-714.
- VOLKONSKY (M.). — 1934 b. Sur la nutrition de quelques Champignons saprophytes et parasites. Ann. de l'Institut Pasteur. T. LII, p. 76.
- WAGER (H.). — 1896. On the structure and reproduction of *Cystopus candidus*. Ann. of Bot. T. 10, p. 295.
- WAGER (H.). — 1900. On the fertilization of *Peronospora parasitica*. Ann. of Bot., T. 14.
- WAKSMAN (S.) et JOFFE (J.). — 1920. Studies in the metabolism of *Actinomycetes*. 4. Changes in reaction as a result of the growth of *Actinomycetes* upon culture media. Jour. Bact., T. 5, p. 31.
- WARD (H. M.). — 1883. Observations on the genus *Pythium* Pringsh. Quart. Journ. Micros. Sc., T. 23.
- WEIER (T. E.). — 1930. Notes on the plastid and other cytoplasmic bodies during sporogenesis and spermatogenesis in *Polytrichum commune*. Proc. of the Nat. Acad. of Sc.
- WEIER (T. E.). — 1931. A study of the moss plastid after fixation by mitochondrial, osmium and silver techniques. I. Plastid during sporogenesis in *Polytrichum commune*. La Cellule, 40, pp. 261-360. II. The Plastid during spermatogenesis in *Polytrichum commune* and *Caltharinacea undulata*. La Cellule, 41, pp. 51-84.
- WEIER (T. E.). — 1932 a. The structure of the bryophytic plastid. American Jour. of Bot., T. 19, pp. 659-672.
- WEIER (T. E.). — 1932 b. A comparison of the plastid with the Golgi zone. Biol. Bull., 62, pp. 126-139.
- WEIER (T. E.). — 1933. Neutral red staining in the protonema of *Polytrichum commune*. American Jour. of Bot., T. 20, pp. 431-439.
- WEIER (T. E.). — 1933. A critique of the vacuome hypothesis. Proto-plasma, T. 19.
- WILLIS (J. C.). — 1925. A dictionary of the flowering plants and ferns.
- ZELLER (S.). — 1916. *Lenzites Saepiaria* Fries with special reference to enzyme activity. Ann. Miss. bot. Gard., 3 ; p. 439.
-

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	7
Plan du travail	8
Matériel	9
Les fixateurs, la fixation et la coloration	10
Technique de préparation des coupes des organes sexuels, technique de Bowen, et procédés microchimiques.	13
Milieus de culture	15
 PREMIÈRE PARTIE : ÉTUDE PHYSIOLOGIQUE DES <i>PYTHIUM</i>	18
CHAPITRE I. — DÉVELOPPEMENT :	
Développement.	18
Degré de rapidité d'extension des colonies	21
Développement comparé des Champignons pendant les 24 premières heures à 20, 25, 30 et 35° C.	23
Développement de <i>P. deliense</i> à différentes températures	23
Action de certains corps sur la croissance de <i>P. deliense</i>	25
Effet du saccharose, du maltose et du glucose sur le développement du <i>P. deliense</i>	28
Effet de l'acide tannique, du rouge neutre, de l'extrait de malt et du malt à l'huile de foie de Morue sur le développement de <i>P. deliense</i>	29
Effet de la concentration en ions H sur la croissance du <i>P. deliense</i>	31
CHAPITRE II. — ORGANES SEXUELS :	
Influence des conditions externes sur la reproduction sexuelle. .	36
A. — Effet de la température	36
B. — Effet du PH du milieu sur la formation des organes sexuels chez <i>P. deliense</i>	37
C. — Effet de la lumière et de l'obscurité	39
D. — Effet du manque d'oxygène	39
E. — Effet des substances nutritives diverses	40
CHAPITRE III. — ACTION HYDROLYTIQUE	44
A. — Hydrolyse de la peptone	45
B. — Hydrolyse des glucides	47
C. — Extraction de l'enzyme	48
D. — Rapidité comparée de l'hydrolyse	48
CHAPITRE IV. — LES SPORANGES	52
 DEUXIÈME PARTIE. — ÉTUDE CYTOLOGIQUE DES <i>PYTHIUM</i>	56
CHAPITRE I. — HISTORIQUE.	56
CHAPITRE II. — MYCÉLIUM	59
A. — Observations sur matériel vivant	59

Le système vacuolaire	60
Le chondriome	63
B. — Observations sur matériel fixé	64
Le système vacuolaire	64
Le chondriome	65
Examens microchimiques	60
Les noyaux	68
CHAPITRE III. — ORGANES SEXUELS	70
A. — Observations sur matériel vivant	70
B. — Observations sur matériel fixé	73
CHAPITRE IV. — A PROPOS DE L'APPAREIL DE GOLGI	78
CHAPITRE V. — DISCUSSION GÉNÉRALE	84
CHAPITRE VI. — Position systématique de quelques espèces du genre <i>Pythium</i> , d'après les données cytologiques	94
Nomenclature du <i>P. deliense</i>	98
CONCLUSIONS	100
Explications des planches	106
Bibliographie	112

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITION DONNÉE PAR LA FACULTÉ

La stérilisation du tissu sporogène des Bryophytes.

Vu et approuvé :

Paris le 22 juillet 1935.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Ch. MAURAIN

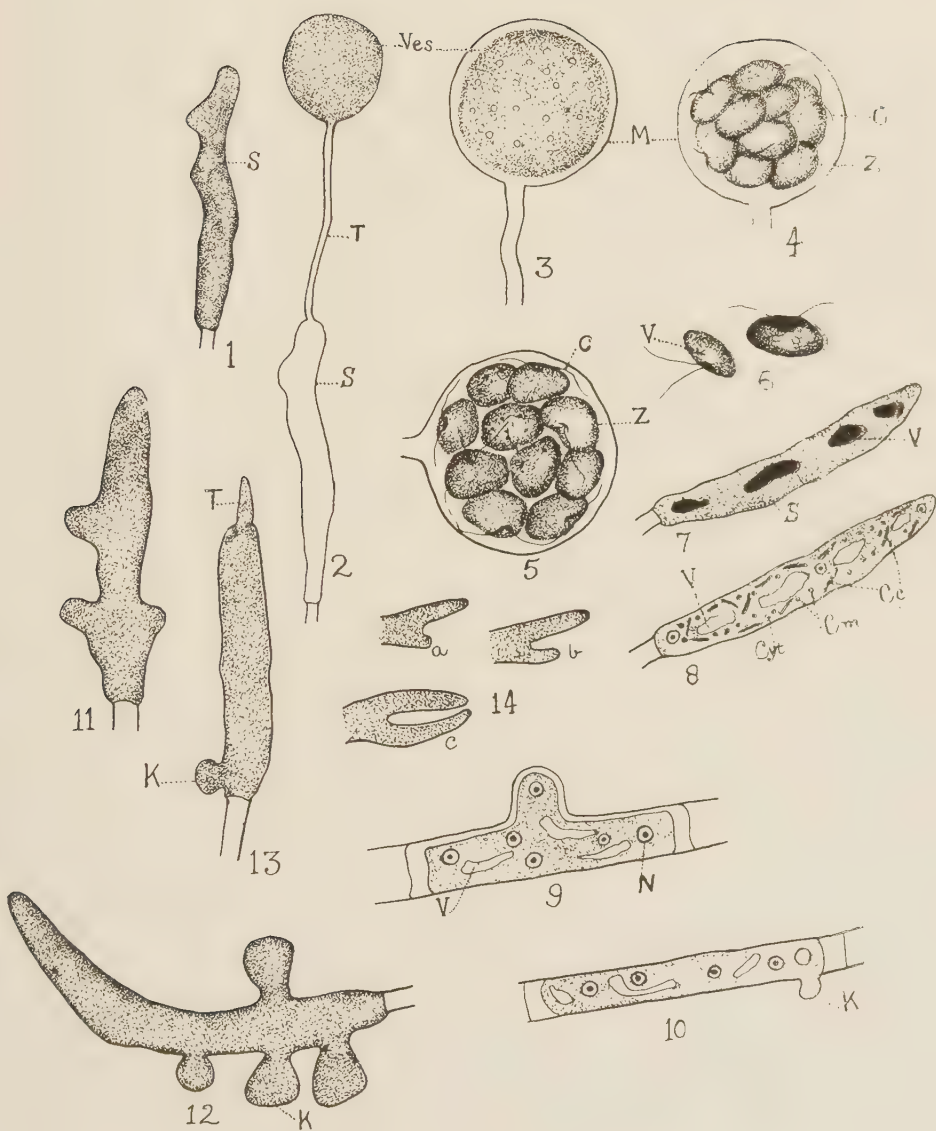
Vu et Permis d'Imprimer

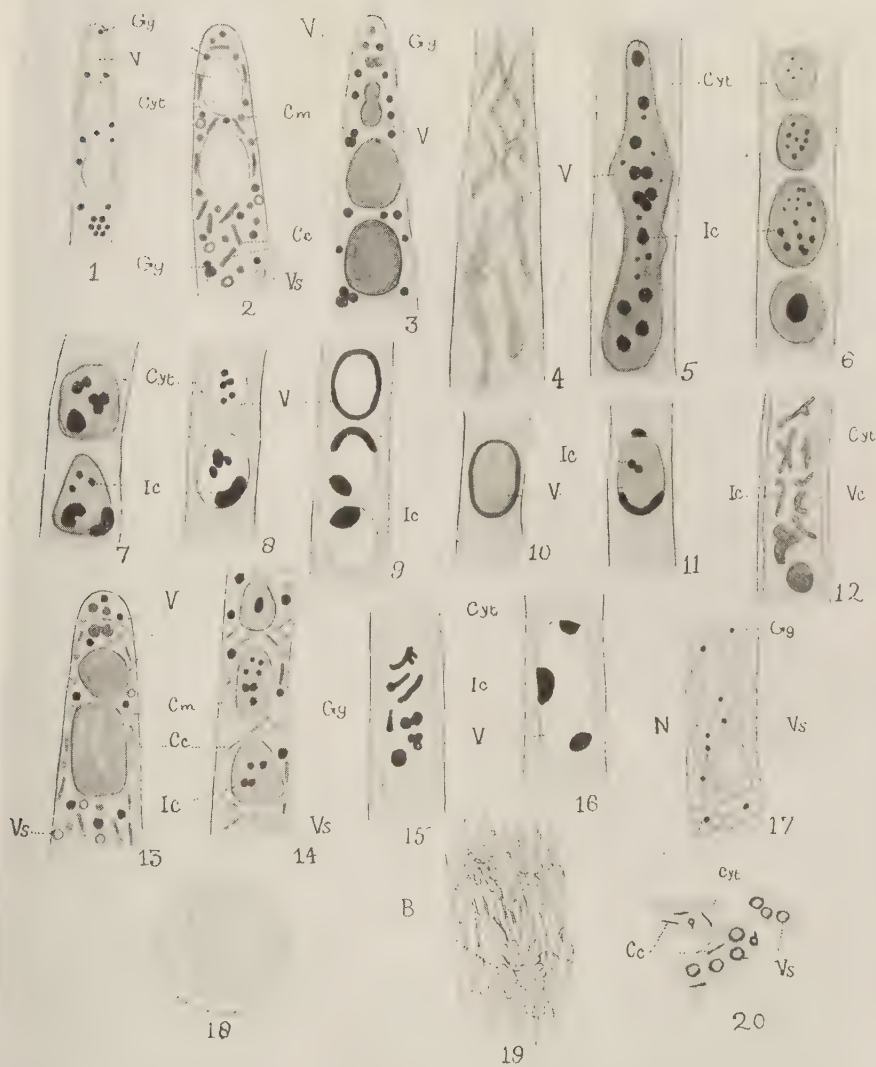
Le Recteur de l'Académie de Paris,

S. CHARLÉTY

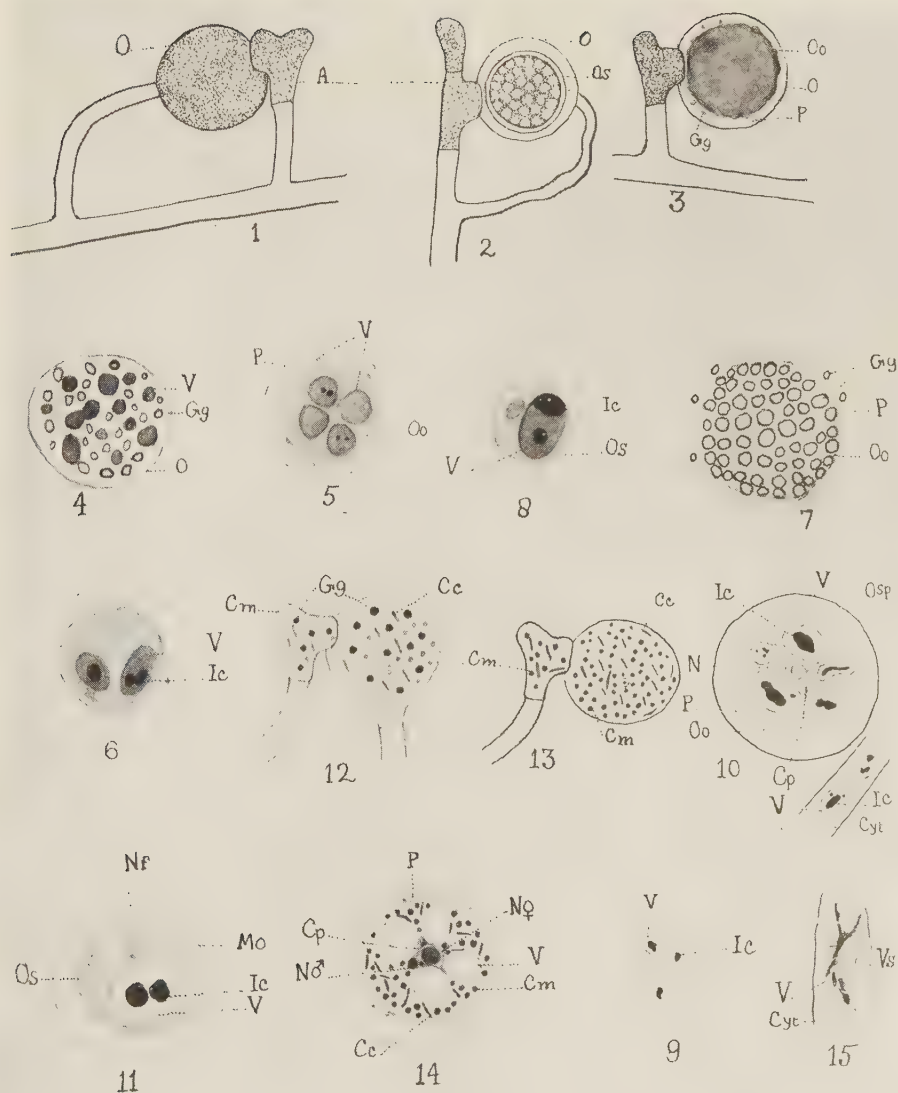
IMPRIMERIE
ANDRÉ LESOT
3, rue des Pliants, 3
NEMOURS (S.-&-M.)

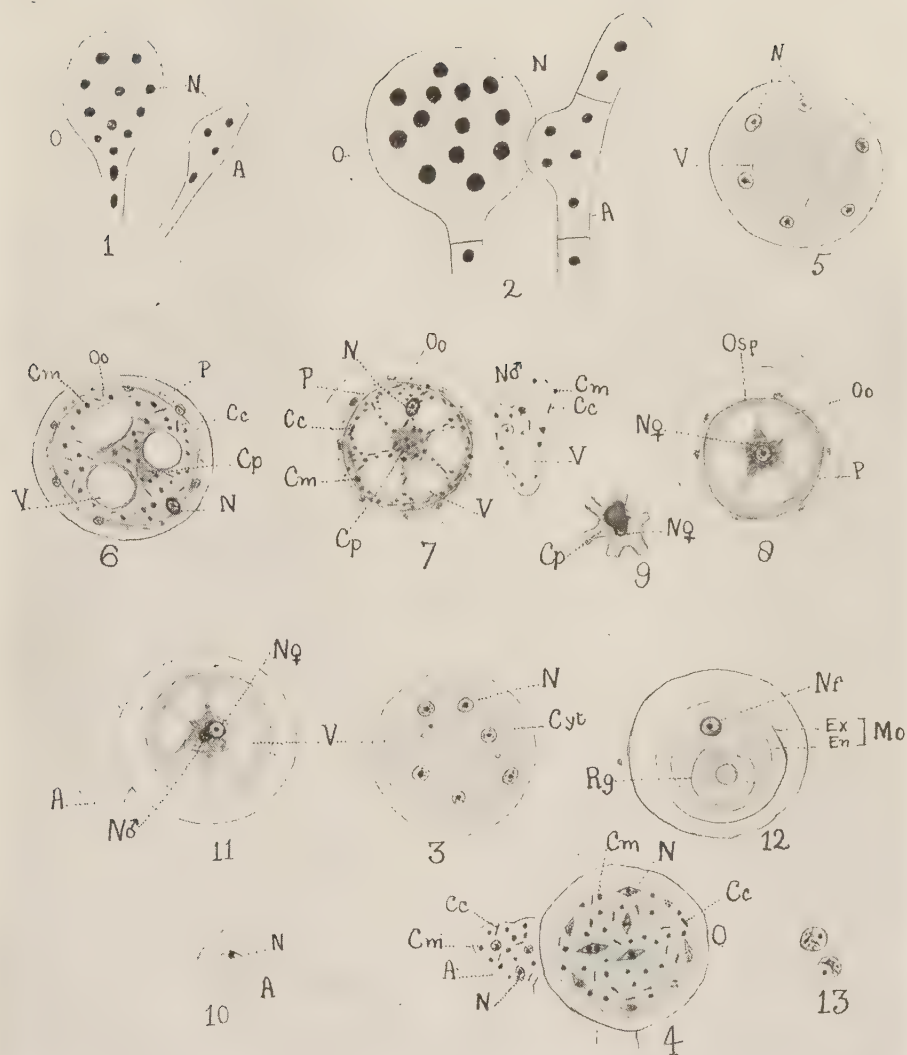
et
10, rue de l'Éperon, 10
— PARIS (VI^e) —

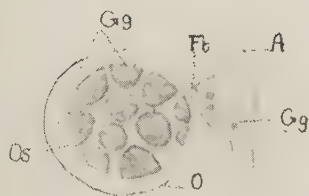




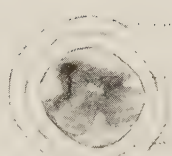








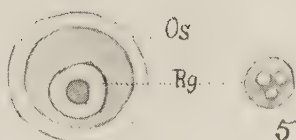
1



2



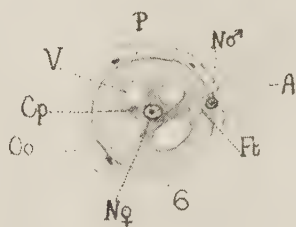
3



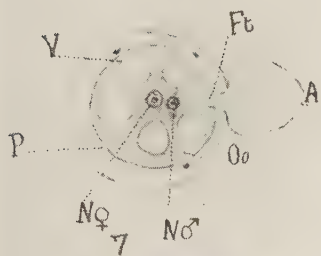
4



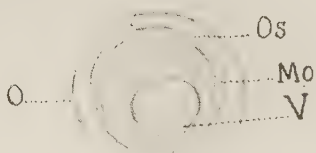
5



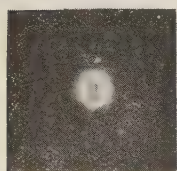
6



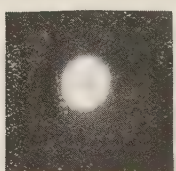
7



8



9



10

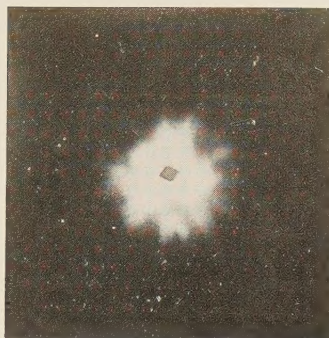
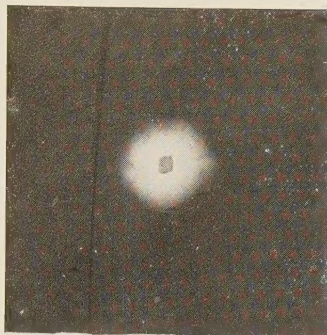
20° C

30° C

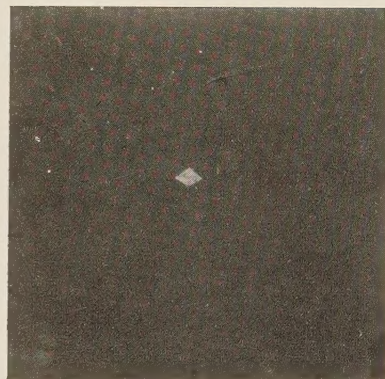
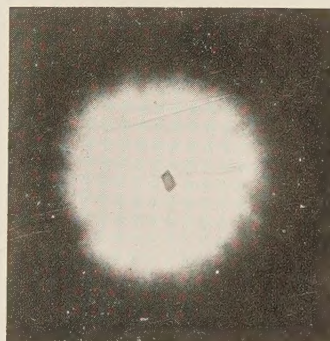
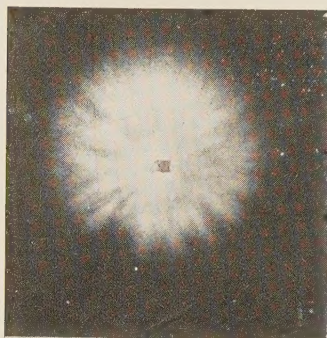
35° C

Planche VII

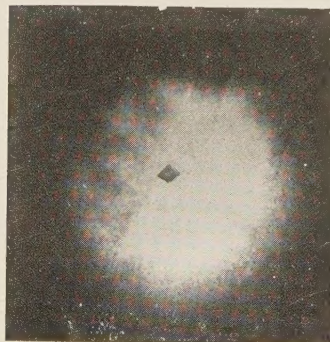
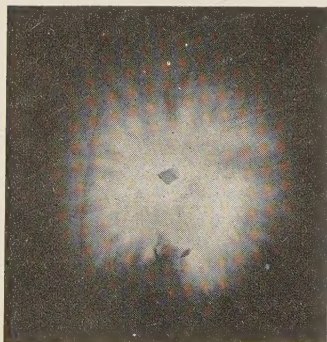
Ind.



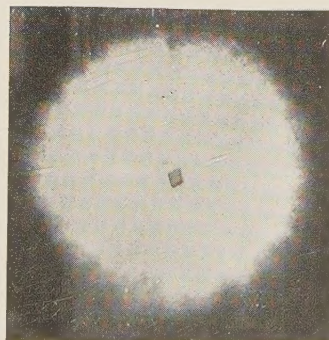
Mam.



Deb.



Del.



0 1 2 3 4 5 6 7 8 cm.

IMPRIMERIE
ANDRÉ LESOT
3, rue des Pliants, 3
NEMOURS (S.-&-M.)
— et —
10, rue de l'Éperon, 10
— PARIS (VI^e) —
